

(19) Japan Patent Office (JP)

(12) Patent Publication (B2)

(11) Patent number

Patent 4220603

(P4220603)

(45) Publication Date February 4, 2009

(24) Registration Date November 21, 2008

(52) Int. Cl.	FI	
C12Q 1/26 (01.2006)	C12Q 1/26	
G01N 1/26 (01.2006)	G01N 21/78	C
G01N 1/26 (01.2006)	G01N 33/52	C

Number of Claims 23 (Total page 32)

(21)[Application number] 1998-342759
 (45)[Application date] December 12,1998
 (65)[Disclosure number] Laid-open 2002-223794
 (P2002-223794A)
 (43)[Disclosure date] August 13, 2002
 [Examination request date] November 25,2005

(73)[Patent Right Holder]
 [ID] 000231394
 [Name or Company Name]
 Alfresa Pharma Corporation
 [Residence or location address] 2-2-9 Kokumachi,
 Chuo-ku, Osaka
 (74)[Agent]
 [ID] 100104673
 [Patent Attorney]
 [Name of Firm name] Hiromichi Nanjo
 (72)[Inventor]
 [Name] Masahiro Yamaguchi
 [Address or residence]
 2-8-20 Kamigori, Ibaraki-shi, Osaka
 (72)[Inventor]
 [Name] Tetsuya Kosaka
 [Address or Residence]
 1-18-613 Nishigawara, Ibaraki-shi, Osaka
 (72)[Inventor]
 [Name] Mitsuyoshi Toyosato
 [Address or Residence]
 6 Hachiman-cho, Kamitakano, Sakyo-ku, Kyoto
 (72)[Inventor]
 [Name] Kouji Mizuno
 [Address or Residence]
 2-1-4-201 Nishisakaidani-cho, Oharano, Nishikyo-
 ku, Kyoto

Continues on final page

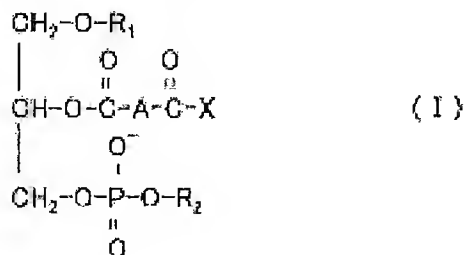
(54)[Title of the Invention] MEASUREMENT METHOD OF PLATELET-ACTIVATING FACTOR
 ACETYLDHYDROLASE

(57)[Scope of Patent Claims]

[Claim 1]

The measurement method of platelet-activating factor acetylhydrolase activity, and the method, formula (I):

[Chemical 1]



10 The measurement method wherein the substrate represented (In the formula, R1 represents acyl group, alkyl group, or alkenyl group, A represents a hydrocarbon of 2 to 7 carbon atoms, saturated or unsaturated, substituted or un-substituted, and oxygen atoms can be interspersed, X represents the color-forming compound or fluorescence color-forming compound when freed, and R2 represents a monomethyl amino group, dimethyl amino group, or trimethyl amino group.) and the sample containing platelet-activating factor acetylhydrolase were allowed to react in the presence of inhibitor that does not inhibit platelet activating factor acetylhydrolase but inhibits other esterolytic activity related substances; in addition, including the measuring of the amount of the color-forming compound or fluorescence color-forming compound freed as a result of reaction, the said sample containing platelet activating factor acetylhydrolase is human or animal blood, serum, plasma, urine, amnion fluid, cells, organs, or the extract fluid of cells and organs, and the said inhibitor is at least one kind of inhibitor selected from a group consisting of anionic
 20 surfactants, nonionic surfactants, bile salts, and derivates of bile salts.

[Claim 2]

The measurement method described in Claim 1 wherein the previously mentioned color-forming compounds are aromatic hydroxy compounds or aromatic thiol compounds.

[Claim 3]

Further, the measurement method described in Claim 1 or 2 wherein chelating agent coexists.

[Claim 4]

30 The measurement method described in Claim 3 wherein previously mentioned coexisting chelating agent is EDTA or EGTA.

[Claim 5]

The measurement method described in any of Claims 1 through 4 wherein the previously mentioned anionic surfactants are alkali metal salts of alkyl sulfuric acid or alkali metal salts of alkyl sulfonic acid.

[Claim 6]

40 The measurement method described in anyone of Claims from 1 through 4 wherein the previously mentioned nonionic surfactants are polyoxyethylene alkylarylethers or polyoxyethylene sobitan fatty acid esters.

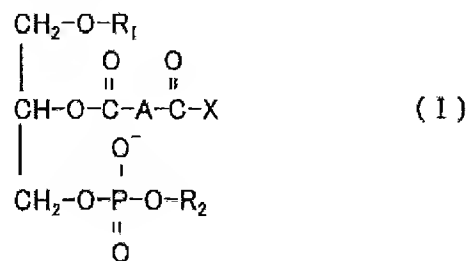
[Claim 7]

The measurement method described on any of Claims 1 through 4 wherein the previously mentioned bile salts and derivates of bile salts are sodium cholate, sodium deoxycholate, sodium chenodeoxycholate, sodium dehydrocholate, sodium taurocholate, sodium tauro lithocholate, sodium taurodeoxycholate, sodium taurochenodeoxycholate, sodium tauroursodeoxycholate, sodium taurodehydrocholate, CHAPS, CHAPSO, BIGCHAP, or deoxy-BIGCHAP

[Claim 8]

The reagent, which is the reagent for measuring platelet-activating factor acetylhydrolase activity in a sample, is that of General Formula (I):

[Chemical 2]



The measurement method wherein the substrate represented (In the formula, R1 represents acyl group, alkyl group, or alkenyl group, A represents a hydrocarbon of 2 to 7 carbon atoms, saturated or unsaturated, substituted or un-substituted, and oxygen atoms can be interspersed, X represents the color-forming compound or fluorescence color-forming compound when freed, and R2 represents a monomethyl amino group, dimethyl amino group, or trimethyl amino group.) and the sample containing platelet-activating factor acetylhydrolase were allowed to react in the presence of inhibitor that does not inhibit platelet activating factor acetylhydrolase but inhibits other esterolytic activity related substances; in addition, including the measuring of the amount of the color-forming compound or fluorescence color-forming compound freed as a result of reaction, the said sample containing platelet activating factor acetylhydrolase is human or animal blood, serum, plasma, urine, amnion fluid, cells, organs, or the extract fluid of cells and organs, and the said inhibitor is at least one kind of inhibitor selected from a group consisting of anionic surfactants, nonionic surfactants, bile salts, and derivatives of bile salts.

[Claim 9]

The reagent described in Claim 8 wherein previously mentioned color-forming compounds are aromatic hydroxy compounds or aromatic thiol compounds.

[Claim 10]

Further, the reagent described in Claim 8 or 9 coexists with chelating agents.

[Claim 11]

The reagent described in Claim 10 wherein previously mentioned chelating agents are EDTA or EGTA.

[Claim 12]

The reagent described in any of the Claims from 8 through 11 wherein the previously mentioned anionic surfactant is an alkali metal salt of alkyl sulfuric acid or alkali metal salt of alkyl sulfonic acid.

[Claim 13]

The reagent described in any of the Claims from 8 through 11 wherein the previously mentioned anionic surfactant is polyoxyethylene alkylarylethers or polyoxyethylene sobitan fatty acid ester.

[Claim 14]

The reagent described in any of Claim 8 through 11 wherein the previously mentioned bile salts and derivatives of bile salts are sodium cholate, sodium deoxycholate, sodium chenodeoxycholate, sodium dehydrocholate, sodium taurocholate, sodium taurodeoxycholate, sodium taurochenocholate, sodium taurodeoxycholate, sodium taurodehydrocholate, CHAPS, CHAPSO, BIGCHAP, or deoxy-BIGCHAP.

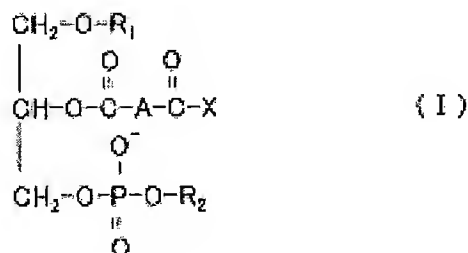
[Claim 15]

The kit for measurement of platelet-activating factor acetylhydrolase activity includes the reagent described in any of the paragraphs of Claim 8 through 14.

[Claim 16]

The kit for measurement of platelet-activating factor acetylhydrolase activation in the test specimen has the General Formula (I):

[Chemical 3]



10 The kit, a container including the substrate represented by (In the formula, R1 represents an acyl group, alkyl group, or alkenyl group of 6 to 20 carbon atoms, X represents the color-forming compound or fluorescence color forming compound when freed, and R2 represents a monomethyl amino group, dimethyl amino group, or trimethyl amino group.), and that does not inhibit platelet-activating factor acetyl hydrolase, but the container possesses inhibitor, which inhibits other esterase hydrolysis activity material, and chelating agents, and the sample is human or animal blood, serum, plasma, urine, amnion fluid, cells, organs, or the extract fluid of cells and organs, and the inhibitor is at least one kind of inhibitor selected from a group consisting of anionic surfactants, nonionic surfactants, bile salts, and derivatives of bile salts.

[Claim 17]

The kit described in Claim 16 wherein the previously mentioned coloring-forming material is aromatic hydroxy compounds or aromatic thiol compounds.

20

[Claim 18]

The kit described in Claim 16 or 17 wherein previously mentioned substrate is solubilized in solution liquid or solvent.

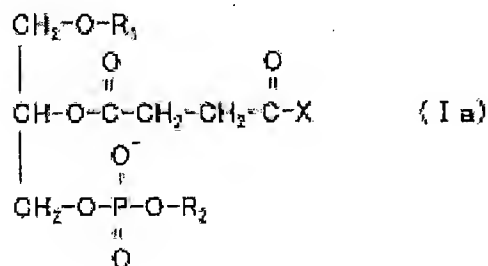
[Claim 19]

Further, the kit described in any Claim from 15 to 18 possessing a container that includes solution liquid or solvent in order to dissolve previously mentioned substrate.

[Claim 20]

30 The compound which is represented by General Formula (Ia):

[Chemical 4]



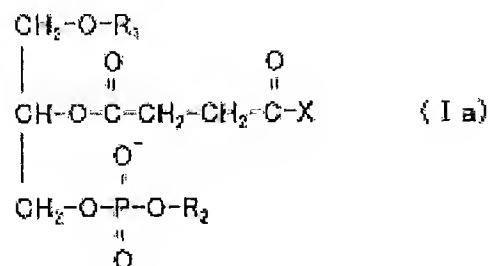
(In the formula, R1 represents an acyl group, alkyl group, or alkenyl group of 6 to 20 carbon atoms, X represents the color-forming compound or fluorescence color-forming compound when freed, and R2 represents a monomethyl amino group, dimethyl amino group, or trimethyl amino group.)

[Claim 21]

40 Compounds described in Claim 20 wherein previously mentioned color-forming compounds are aromatic hydroxy compounds or aromatic thiol compounds.

[Claim 22]

The method of measurement for platelet-activating factor acetylhydrolase activity in General Formula (Ia):
[Chemical 5]



10 The measurement method wherein the substrate represented (In the formula, R1 represents an acyl group, alkyl group, or alkenyl group of 6 to 20 carbon atoms, X represents the color-forming compound or fluorescence color forming compound when freed, and R2 represents a monomethyl amino group, dimethyl amino group, or trimethyl amino group.) is reacted with the sample containing platelet-activating factor acetyl hydrolase; thereby measuring the amount of color-forming compound or fluorescence color-forming compound contained, and is the measurement method of the platelet-activating factor acetyl hydrolase contained in the sample, human or animal blood, serum, plasma, urine, amnion fluid, cells, organs, or the extract fluid of cells and organs.

[Claim 23]

The measurement method described in Claim 22 wherein previously mentioned color-forming compounds are aromatic hydroxy compounds or aromatic thiol compounds.

[Detailed description of Invention]

20 [0001]

[Technical field associated with the Invention]

The present invention pertains to the method of measuring clinically significant platelet-activity factor acetylhydrolase activity, the reagent for platelet-activity factor acetylhydrolase activity measurement, and the measurement kit for platelet-activity factor acetylhydrolase activity that utilizes the reagent.

[0002]

[Prior Art]

30 PAF (Platelet Activating Factor: 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocoline (hereinafter referred to as PAF) is the mediator pertaining to the wide range of the onset of various clinical conditions such as inflammation or allergic response. On the other hand, platelet-activity factor acetylhydrolase (hereinafter referred to as PAF-AH) possesses a function of eliminating strong biological activity that PAF possesses, adjusts the in vivo PAF level, and pertains to maintaining the homeostasis. And in the diseases such as Kawasaki disease, systemic lupus erythematosus, and hemolytic uremic syndrome, fluctuation of PAF-AH activity in serum, which cannot be recognized when in good health condition, is being observed in the course of the progression of these clinical conditions.

[0003]

40 In this way, since the PAF-AH activity in serum or plasma reflects the onset and the clinical condition change of patients with various inflammatory diseases, the measurement of PAF-AH activity is important as a novel clinical test method that will bring useful information to diagnose these diseases. Furthermore, patients with serum PAF-AH absence exist, and this enzyme defect is considered a risk factor for severe asthma in children; therefore, it has been suggested that the measurement of PAF-AH activity is important also from the aspect of preventive medicine.

[0004]

In conventional measurement of PAF-AH activity, the method according to bioassay and the method that employs radioisotopes have been used.

50

[0005]

The bioassay method is the method to measure PAF-AH by monitoring the platelet aggregation ability by the remaining PAF when PAF-AH and substrate PAF are allowed to react for a fixed period of time; however, disadvantages such as the necessity for preparation when blood platelet is in use and expensive reagent has to be used led to difficult problems when employed for general test method.

[0006]

On the other hand, the method that employs radioisotopes (RIA method) is the method to measure the free radioactivity by labeling PAF acetyl group with ^3H or ^{14}C , which is allowed to react with PAF-AH, or the method to measure radioactivity or by labeling the alkyl group, which is allowed to react with PAF-AH, and collecting the product of reaction lyso PAF or unreacted PAF. However, this method that employs radioisotopes which limit the users and the equipment in use for the radioactive materials, in addition to the safety problems and the disposal problems of radioactive reagent. Furthermore, when measuring the remaining radioactivity by collecting the labeled lyso PAF or unreacted labeled PAF, complicated procedures such as extracting lyso PAF or PAF with organic solvents and separating by chromatography are necessary, and these pose difficult problems for a general test method.

[0007]

As a result, the method to measure PAF-AH activity that does not require such complicated operations is being examined.
On of the methods is to use synthetic substrate, and in recent years, various kinds of PAF-AH substrate and PAF-AH measurement methods have been developed.

[0008]

For example, in JP Laid-Open No. 1995-59597, the method to measure PAF-AH activity with compounds similar to PAF, which frees dicarboxylic acid by PAF-AH action, as substrate is described. This method generates dicarboxylic acid by enabling the PAF-AH in the sample to act on this substrate; and generates universally- used marker materials such as NAD^+ , NADP^+ , NADH , NADPH or hydrogen peroxide by enabling the enzyme that is specifically reactive with the generated dicarboxylic acid to act, and furthermore, combining the continuous enzyme reaction system; and by measuring these marker materials with the known method, calculates the generation rate and the formation of dicarboxylic acid, thereby measuring the PAF-AH activity. Since this method is an enzymatic assay that combines a number of enzymes in the detection assay, there will be problems such as the safety and the specificity of the enzyme that will be used, and furthermore, special attention is required to maintain the reagent performance.

[0009]

Furthermore, in JP Laid-Open No. 1992-346797, PAF-AH activity measurement method with thio PAF and thio PAF analog compounds as substrate is described. This method is the method that utilized the color reagent that quantitatively colors by reacting with the SH group. In this Patent Publication, an example is described of the method to keep track of the yellow color of 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid that frees by the displacement reaction between lysothio PAF-SH group, generated by PAF-AH from the substrate such as thio PAF, and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); this method, however, is likely to receive interference from other thiol compounds and redox substances that coexist in reaction liquid or specimen material such as ascorbic acid, bilirubin, cysteine or glutathione, which generates problems from the aspect of performance maintenance of the reagent as in the case of the enzymatic assay.

[0010]

The PAF-AH activity measurement method with 1-dodecanoyl -2-(4-Nitrophenyl glutaryl)-sn- glycerol-phosphocholine, which is compound similar to PAF, as substrate is known (Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Volume16, No 4591-599 (1996). However, since, with this measurement method, the substrate is hydrolyzed by various kinds of esterase or esterase-like substances existing in the specimen material of the plasma or serum, the measurement value received a significant positive impact, and accurate measurement of PAF-AH activity was difficult.

[0011]

[Problems the invention tries to solve]

Hence, the PAF-AH activity measurement method that does not receive influence from various kinds of esterase or esterase-like substances with a safe and easily to operate direct measurement method without using radioactive substrate has been anticipated.

Namely, the substrate with high specificity in PAF-AH or the development of the measurement system that does not receive the influence of various kinds of esterase and esterase-like substances were anticipated.

[0012]

[Means of solving the problems]

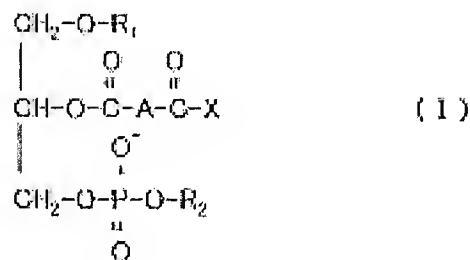
10 The present inventors, as a result of intense study to solve the problems mentioned above, have found the PAF-AH measurement system, with the substrate having comparatively high specificity in PAF-AH, that does not receive the influence of various kinds of esterase and esterase-like substances, and developed a safe and easily operable method that can measure PAF-AH activity directly without using radioactive substrate, and thereby completed the present invention.

[0013]

The present invention is a measurement method of PAF-AH activity and has the general formula (I):

[0014]

[Chemical 6]



20

[0015]

(In the formula, R1 represents acyl group, alkyl group, or alkenyl group, A represents the hydrocarbon group with 2-7 carbon atoms that oxygen atoms can mediate, saturated or unsaturated, substituted or unsubstituted, X represents the group that will become color-forming compounds or fluorescence color-forming compounds when freed, and R2 represents monomethyl aminoethyl group, methylaminoethyl, dimethylaminoethyl group, or trimethylaminoethyl group.) This pertains to the method that includes: the substrate represented by that above is allowed to react with samples in which platelet-activity factor acetylhydrolase is contained, under the presence of inhibitor that does not inhibit platelet-activity factor acetylhydrolase but inhibits other esterolytic activity related substances, and to measure the amount of color-forming compounds or fluorescence color-forming compounds freed by this reaction.

30

[0016]

In a preferred embodiment, the previously mentioned color-forming compounds are aromatic hydroxy compounds or aromatic thiol compounds.

[0017]

In a preferred embodiment, the inhibitor used for the measurement method of this invention is at least one kind of inhibitor selected from the group composed of anionic surfactant, non-ionic surfactant, bile salts, bile salt derivatives, and chelating agents.

40

[0018]

Moreover, in a preferred embodiment, the anionic surfactant used for the measurement method of this invention is alkali metal salt of alkyl sulfuric acid or alkali metal salt of alkyl sulfonic acid.

[0019]

Moreover, in a preferred embodiment of nonionic surfactants included in the measurement method of the present invention is polyoxyethylene alkylarylethers, or polyoxyethylene sobitan fatty acid esters.

50

[0020]

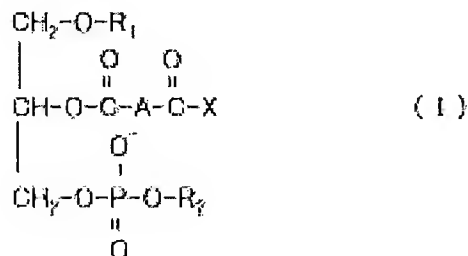
Also in a preferred embodiment, bile salts and bile salt derivatives used for the measurement method of this invention are sodium cholate, sodium deoxycholate, sodium chenodeoxycholate, sodium dehydrocholate, sodium taurocholate, sodium tauroolithocholate, sodium taurodeoxycholate, sodium taurochenodeoxycholate, sodium tauroursodeoxycholate, sodium taurodehydrocholate, CHAPS, CHAPSO, BIGCHAP, or deoxy-BIGCHAP.

[0021]

Also in this invention pertaining to the reagent for PAF-AH activity measurement, the general formula is (I):

[0022]

[Chemical 7]



[0023]

(In the formula, R1 represents acyl group, alkyl group, or alkenyl group, A represents the hydrocarbon group with 2-7 carbon atoms that oxygen atoms can mediate, saturated or unsaturated, substituted or unsubstituted, X represents the group that will become color-forming compounds or fluorescence color-forming compounds when freed, and R2 represents monomethyl aminoethyl group, methylaminoethyl, dimethylaminoethyl group, or trimethylaminoethyl group.) This pertains to the reagent that contains: the substrate represented by that above and the inhibitor that inhibits other esterolytic activity related substances, though it does inhibit PAF-AH.

[0024]

In a preferred embodiment, reacting with PAF-AH, aromatic hydroxy compounds or aromatic thiol compounds are released from the substrate.

[0025]

In a preferred embodiment, the inhibitor contained in the reagent of this invention is at least one kind of inhibitor selected from the group composed of anionic surfactant, non-ionic surfactant, bile salts, bile salt derivatives, and chelating agent.

[0026]

Moreover, Moreover, in a preferred embodiment, the anionic surfactant contained in the reagent of this invention is alkali metal salt of alkyl sulfuric acid or alkali metal salt of alkyl sulfonic acid.

[0027]

Moreover, in a preferred embodiment, nonionic surfactants included in the reagent of the present invention are polyoxyethylene alkylarylethers, or polyoxyethylene sobitan fatty acid esters.

[0028]

Also in a preferred embodiment, bile salts and bile salt derivatives contained in the reagent of this invention are sodium cholate, sodium deoxycholate, sodium chenodeoxycholate, sodium dehydrocholate, sodium taurocholate, sodium tauroolithocholate, sodium taurodeoxycholate, sodium taurochenodeoxycholate, sodium tauroursodeoxycholate, sodium taurodehydrocholate, CHAPS, CHAPSO, BIGCHAP, or deoxy-BIGCHAP.

[0029]

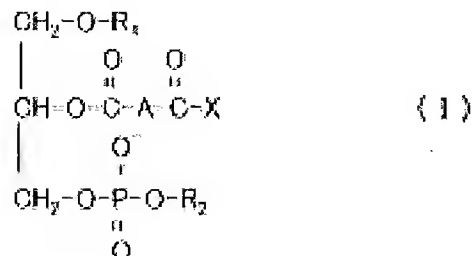
The present invention further pertains to the kit for platelet-activating factor acetylhydrolylase activity measurement, including previously mentioned reagents.

[0030]

Moreover, the present invention is a kit for PAF-AH activity measurement, having the above mentioned general formula:

[0031]

[Chemical 8]



10 [0032]

(In the formula, R1 represents acyl group, alkyl group, or alkenyl group, A represents the hydrocarbon group with 2-7 carbon numbers that the oxygen atom can mediate, saturated or unsaturated, substituted or un-substituted, X represents the group that will become color-forming compounds or fluorescence color-forming compounds when freed, and R2 represents monomethyl aminoethyl group, methylaminoethyl, dimethylaminoethyl group, or trimethylaminoethyl group.) This pertains to the kit that possesses: the container containing the substrate represented by the above in parenthesis and the container containing the solution containing the inhibitor that inhibits other esterolytic activity related substances, though it does inhibit PAF-AH.

20 [0033]

In a preferred embodiment, reacting with PAF-AH, aromatic hydroxy compounds or aromatic thiol compounds are released from the substrate.

[0034]

In a preferred embodiment, the previously mentioned substrate is solubilized in the solution or solvent.

[0035]

In a separate suitable embodiment, the kit of the present invention, further, possesses a container including the solubilizing solution or solvent medium of the previously mentioned substrate.

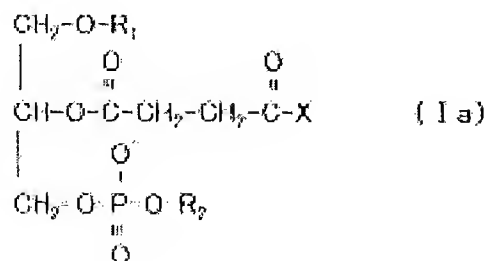
30

[0036]

Furthermore, the present invention is the compound which is represented by general formula (Ia):

[0037]

[Chemical 9]



40

[0038]

This pertains to the following: (In the formula, R1 represents acyl group from 6 to 20 carbon atoms, alkyl group, or alkenyl group, X represents the group that will become color-forming compounds or fluorescence color-forming compounds when freed, and R2 represents monomethyl aminoethyl group, methylaminoethyl, dimethylaminoethyl group, or trimethylaminoethyl group.)

[0039]

In a preferred embodiment, the previously mentioned color-forming compounds are aromatic hydroxy compounds or aromatic thiol compounds.

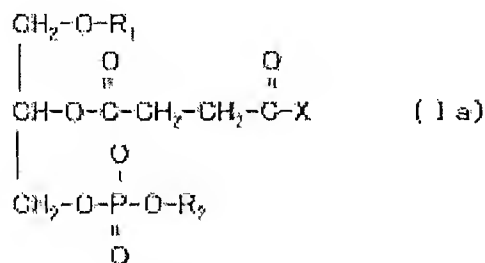
10

[0040]

Moreover, the present invention in regard to the measurement method of PAF-AH activity is a compound which is represented by general formula (Ia):

[0041]

[Chemical 10]



[0042]

20 (In the formula, R1 represents acyl group from 6 to 20 carbon atoms, alkyl group, or alkenyl group, X represents the group that will become color-forming compounds or fluorescence color-forming compounds when freed, and R2 represents monomethyl aminoethyl group, methylaminoethyl, dimethylaminoethyl group, or trimethylaminoethyl group.) This pertains to the measurement method that includes: the substrate represented by the above in parenthesis is allowed to react with PAF-AH contained sample, and to measure the amount of color-forming compounds or fluorescence color-forming compounds freed by this reaction.

[0043]

In a preferred embodiment, the previously mentioned color-forming compounds are aromatic hydroxy compounds or aromatic thiol compounds.

30

[0044]

By the invention mentioned above, the PAF-AH direct measurement system with the substrate having relatively high specificity in PAF-AH and without receiving influence of various kinds of esterase or esterase-like substances can be provided. Further, the method provides sufficient utilization as a safe, fast, and simple measurement method in everyday testing since the present invention does not use radio-labeled substrate. Thus, the PAF-AH measurement method of the present invention enables accurate measurement, compared to the conventional method of using the enzyme or reagent that induce color development system, based on the following advantages: (1) the measurement time is shorter than the conventional method; (2) there will be no influence from various kinds of esterase or esterase-like substances; (3) the direct PAF-AH activity can be measured by monitoring the color-forming compounds or the fluorescence color-forming compounds. Therefore, the present invention has extremely high usability in diagnosing in a short time the pre- and post progress testing of patients.

40

[0045]

Furthermore, with this invention, the reagent for PAF-AH measurement use and the kit that includes this are provided. With these, reagent and the kit, diagnosis of the diseases and the disease progress based on the change in PAF-AH activity can be grasped since direct and simple PAF-AH activity can be measured. Consequently, the contribution of the present invention to medical treatment is significant.

50

[0046]

[Embodiment of the Invention]

(Characteristics of the Measurement Method of the Present Invention)

10 The characteristics of the measurement method of the platelet-activity factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity lie in that by adding the inhibitor that inhibits esterolytic activity related substances other than PAF-AH along with the substrate represented by the above general formula(1), the release of color-forming compounds or the fluorescence color-forming compounds by the non-specific hydrolysis due to these esterolytic activity related substance can be prevented and PAF-AH activity is measured more precisely.

Namely, the characteristic is in the designing of the measurement system in a way that color-forming or fluorescence color-forming compounds freed from the substrate originates as much as possible only from PAF-AH. Moreover, among the substrates of general formula (I), measurement may be performed with further sensitivity when the substrate employed is represented by general formula (Ia).

[0047]

20 The substrate used in this invention, when reacting with PAF-AH, frees dicarboxylic acid derivative which is linked with color-forming or fluorescent color-forming compounds, and this dicarboxylic acid derivative possesses the characteristic that, when freed, frees (releases) the color-forming or fluorescence color-forming compounds. Namely, when the substrate used in the present invention reacts with PAF-AH, the reaction frees the color-forming or fluorescent color-forming substituted aromatic compounds in the amount proportional to the PAF-AH activity; therefore, by monitoring the freed color-forming or fluorescent color-forming compounds, PAF-AH activity can be directly measured.

[0048]

30 In the conventional measurement method, the dicarboxylic acid generated by having the substrate contact with PAF-AH is led enzymatically to the color development system or, through the substitution with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), the freed 2-nitro-5-mercaptobenzoic acid is led to the color development system; since the method does not provide the direct color development, a number of factors contribute to the inaccuracy of the measurement such as the resolution of the substrate itself with the additional deterioration of the composition that leads to the loss of activity of the enzyme or other color development system, thus making it difficult to obtain accurate PAF-AH activity.

[0049]

40 With the measurement method in the present invention, particular effectiveness is achieved that these problems can be solved. Namely, in the measurement method of the present invention, color-forming or fluorescence color-forming compounds directly detectable by PAF-AH is generated, and PAF-AH activity can be measured more precisely by decreasing the measurement error, due to the esterolytic activity related substance contained in the serum samples or plasma samples, to as little as possible.

[0050]

In this specification, "esterolytic activity related substance" contains the enzyme or the substance that cleaves the ester bond such as ester-cleaving enzyme (esterase) and ester-cleaving-enzyme (esterase)-like substances. As ester-cleaving-enzyme (esterase)-like substances, the protein that possesses esterase activity such as apolipoprotein B contained in LDL, for example, can be listed.

[0051]

50 In the following, the substrate used for the present invention, its manufacturing method, the inhibitor used in this invention, the reagent for PAF-AH measurement, the measurement method used for the reagent, and the PAF-AH measurement kit will be described sequentially.

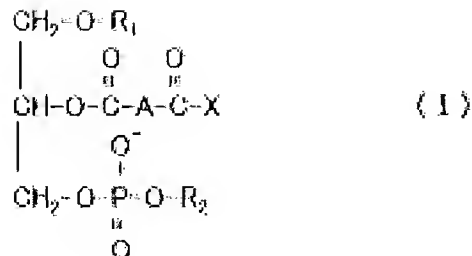
[0052]

(Substrate used in the present invention)

The substrate used in PAF-AH measurement method of the present invention is represented in the general formula (I):

[0053]

[Chemical 11]



[0054]

Here, R1 is preferable as acyl group, alkyl group, or alkenyl group. The number of carbon atoms preferable is from ca. 6 to ca. 20. More preferable is from ca. 8 to ca. 18.

10 [0055]

The preferable hydrocarbon group as A is saturated or unsaturated, substituted or non-substituted, and has carbon atoms from 2 to 7. Among these; compounds of 2 carbon atoms are preferable. Moreover, it is appropriate when oxygen atoms mediate in this hydrocarbon group. Namely, it is appropriate to possess a structure such as -C-O-C-.

[0056]

20 X is preferable as PAF-AH reacting with substrate, the freed (released) compound when dicarboxylic acid derivative is freed, preferably is color-forming or fluorescence color-forming. X, preferably, becomes the group of aromatic hydroxy reacts or aromatic thiol compound when hydrolyzed, and, for example, 4-nitrophenyl group, 2-chloro-4-nitrophenyl group, 2-fluoro-4-nitrophenyl group, 3-fluoro-4-nitrophenyl group, 4-nitrothiophenyl group, 5-indolyloxy group, 2,6-diphenyl-4-nitrophenyl group can be listed.

[0057]

4-methyl coumaryl group, coumaryl group, and flavonoxyl group can be cited as fluorescence color-forming compounds.

[0058]

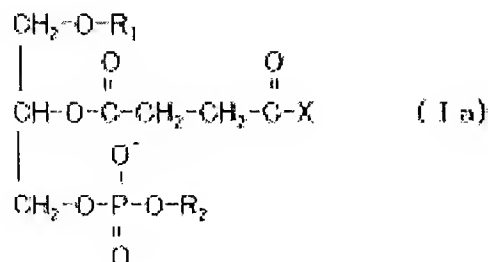
30 Monomethyl amino group, dimethyl aminoethyl group, or trimethyl aminoethyl group can be cited as an example of R2. Trimethylamino group is preferable.

[0059]

Among substrates, this is a substrate wherein A is 2 carbons can be represented by general formula (Ia).

[0060]

[Chemical 12]



[0061]

In general formula (Ia), R₁, X, and R₂ are respectively the same as the previously mentioned R₁, X, and R₂. For example, 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl succinyl)-sn-glycero-phosphocholine is preferable as the compound which is formula (Ia). This compound possesses an efficacy by which the sensitivity increases four-fold in comparison to 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl succinyl)-sn-glycero-phosphocholine when the carbon atoms of A are 3.

10 [0062]

Other than the above described substrate, hereinafter, examples of substrates as the substrate which is used in the present invention are presented, but the substrate is not limited to these.

- 1- Octanoyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Decanoyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Lauroyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- myristoyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Oleoyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Alkyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 20 1- Alkenyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine
- 1- Myristoyl-2-(4-nitrophenyl adipoyl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-(4-nitrophenyl pimeloyl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-(4-nitrophenyl suberoyl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-(4-nitrophenyl azeloyl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-(2-chloro-4-nitrophenylglutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-(4-methyl-coumaroyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-(2-fluoro-4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-(3-fluoro-4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-(4-nitro-thiophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 30 1- Myristoyl-2-(5-indolyloxy glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-(2,6-diphenyl-4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-(4-nitrophenyl glycolyl)-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-[5-dimethylamino-2-(2-triazolylazo) succinyl]-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-[1-(2-triazolylazo)-2-naphthyl succinyl]-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-[(4-nitrophenyl) vinyl dimethyl succinyl]-sn-glycero-phosphocholine,
- 1- Myristoyl-2-[(6-flavonoxyl) succinyl]-sn-glycero-phosphocholine, and
- 1- Palmitoyl-2-(4-nitrophenyl succinyl)-sn-glycero-phosphocholine.

[0063]

40 (Manufacturing method of substrate used in the present invention)

The substrate of PAF-AH used for the present invention can be manufactured in accordance with the known method itself. Details are explained with the synthesis example discussed later. For example, the method described in JP Laid-Open No. 52-89622 is to use as the starting materials 1-acyl glycerophosphocholine, 1-O-alkylphosphocholine (commercial lyso PAF), and 1-O-alkenylphosphocholine (commercial lysophosphocholine plasmalogen) etc., which can be obtained using phospholipase A₂, and to permit these starting materials to react with anhydrous dicarboxylic acid (succinic anhydride, for example) in the mixed solution of anhydrous chloroform and anhydrous dichloromethane with triethylamine as catalyst, and obtain 1-acyl-2-monodicarbonyl-phosphocholine by introducing dicarboxylic acid at the desired position 2. Then, 1-acyl-2-succinyl-phosphocholine is obtained

50

when succinic acid anhydride is used.

[0064]

1-acyl-monodicarbonyl-phosphocholine obtained this way, according to the description of William N. Washburn, et al. J. Am. Chem. Soc. Volume 112, pp. 2040-2041(1990), is turned into chloride by oxalyl chloride, and chromophore aromatic hydroxy reactants, p-nitrophenol, for example, esterifies in the presence of triethylamine, and 1-acyl-2-(4-nitrophenyl succinyl)-phosphocholine is obtained.

[0065]

Also, when introducing dicarboxylic acid with a long methylene group in position 2, monobenzyl carboxylic acid ester obtained from the reaction of anhydrous dicarboxylic acid and protective group benzyl alcohol (Experimental Chemistry Course 22, 4th edition, Organic Synthesis IV, p. 131) can be used. According to the method described in JP Laid-Open No. 52-89622 mentioned above, 1-acyl-2-monobenzyl-carbonyl-phosphocholine is obtained by allowing monobenzyl carboxylic acid ester and 1-acyl glycerophosphocholine to react. Next, the obtained monobenzyl form is debenzylated using palladium on carbon under hydrogen gas atmosphere, and 1-acyl-2-monocarbonyl phosphocholine is obtained. 1-acyl-2-monodicarbonyl-phosphocholine, obtained this way, is transformed into the chloride by oxalyl chloride, and chromophore aromatic hydroxy compounds which are the chromophore, p-nitrophenol, for example, esterifies in the presence of triethylamine, and 1-acyl -2-(4-nitrophenyl succinyl)-phosphocholine is obtained.

[0066]

(The inhibitor used for the present invention)

As the measurement method in the present invention, the preferable method should be performed in the presence of inhibitor that inhibits other esterolytic activity related substance, though it does inhibit PAF-AH. Here, "the inhibitor that inhibits other esterolytic activity related substances, though it does inhibit PAF-AH" contains the meaning, though not inhibiting PAF-AH, that other esterolytic activity related substances are inhibited and the meaning, though not inhibiting at a certain concentration, the inhibitor inhibits other esterolytic activity related substances.

[0067]

In PAF-AH activity measurement, the ester bond of the substrate is hydrolyzed non-specifically by other esterolytic activity related substances present in serum or plasma samples, and X(color-forming compounds, for example) in general formula(I) and (Ia) is freed and becomes PAF-AH activity noise, which is not preferable. Therefore, when measuring PAF-AH of serum or plasma samples, it is preferable to have the inhibitor (hereinafter sometimes referred to as nonspecific reaction inhibitor) that inhibits other esterolytic activity related substances though not inhibiting PAF-AH.

[0068]

As the inhibitors, anionic surfactant, nonionic surfactant, bile salts, and bile salt derivatives, etc. are used, though not limited to these. Only 1 kind or a combination of more than 2 kinds can be used for inhibitors. Preferred combinations are anionic surfactant and nonionic surfactant, or anionic surfactant and bile salts or bile salt derivatives. More than 2 of the same kinds of inhibitors can be used.

[0069]

Anionic surfactants, at a minimum, at least 1 of the anionic surfactants selected from the following groups are preferable. As anionic surfactants are: fatty acid salts (examples, sodium stearate, potassium oleate etc.), alkyl sulfate ester salts (examples, sodium lauryl sulfate, lithium lauryl sulfate, etc.), alkylbenzene sulfonates (examples, sodium laurylbenzene sulfonate, sodium 4-n-octylbenzene sulfonate, etc.), alkyl naphthalene sulfonate (examples, sodium 2-naphthalene sulfonate, etc.), alkyl sulfosuccinate (examples, sodium dialkyl sulfosuccinate, etc.) alkyl diphenyl ether disulfonate (examples, sodium alkyl di-phenyl ether disulfonate, etc.), alkyl phosphate (examples, potassium alkyl phosphate, etc.), polyoxyethylene alkyl ether sulfates (examples, sodium polyoxyethylene lauryl ether sulfate, triethanolamine polyoxyethylene lauryl ether sulfate, etc.), polyoxyethylene lauryl ether sulfates (examples, sodium polyoxyethylene alkyl aryl ether sulfate, etc.), alkyl sulfonates (examples, sodium octane sulfonate, sodium nonan sulfonate, sodium decane sulfonate, sodium tri-decane sulfonate, etc.) naphthalene sulfonate formalin condensates (examples, sodium salt of beta-naphthalene sulfonate formalin condensate, etc.), and polyoxyethylene alkyl ester phosphates.

[0070]

Nonionic surfactants, at a minimum, at least 1 of the nonionic surfactants selected from the following groups are preferable. As nonionic surfactants are: fatty acid salts (examples, sodium stearate, potassium oleate etc.), alkyl sulfate ester salts (examples, sodium lauryl sulfate, lithium lauryl sulfate, etc.), alkyl benzene sulfonates (examples, sodium laurylbenzene sulfonate, sodium 4-n-octylbenzene sulfonate, etc.), alkyl naphthalene sulfonates (examples, sodium 2-naphthalene sulfonate, etc.), alkyl sulfosuccinate (examples, sodium dialkyl sulfosuccinate, etc.) alkyl diphenyl ether disulfonate (examples, sodium alkyl di-phenyl ether disulfonate, etc.), alkyl phosphate (examples, potassium alkyl phosphate, etc.), polyoxyethylene alkyl ether sulfates (examples, sodium polyoxyethylene lauryl ether sulfate,

triethanolamine polyoxyethylene lauryl ether sulfate, etc.), polyoxyethylene lauryl ether sulfate (examples, sodium polyoxyethylene alkyl aryl ether sulfates, etc.), alkyl sulfonate (examples, sodium octane sulfonate, sodium nonan sulfonate, sodium decane sulfonate, sodium tri-decane sulfonate, etc.) naphthalene sulfonate formalin condensates (examples, sodium salt of beta-naphthalene sulfonate formalin condensate, etc.), polyoxydiethylene alkyl amines, and alkyl alkanol amides.

[0071]

10 Bile salts and derivatives of bile salts, at a minimum, at least 1 of these, selected from among the following groups are preferable. As bile salts and bile salt derivatives are: sodium cholate, sodium deoxycholate, chenodeoxycholate, sodium dehydrocholate, sodium taurocholate, sodium tauroolithocholate, sodium taurodeoxycholate, sodium taurochenodeoxycholate, sodium taurooursodeoxycholate, sodium taurodehydrocholate, CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] propanesulfonic acid, CHAPSO: 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-2- hydroxy-propanesulfonic acid, BIGCHAP : N, N-Bis (3-D-gluconamidopropyl) cholamide, and BIGCHAP: N, N-Bis (3-D-gluconamidopropyl) deoxycholamide.

[0072]

(Reagent for the PAF-AH activity measurement)

20 The reagent for the PAF-AH activity measurement in the present invention contains PAF-AH substrate represented by the above general formula (I) and (Ia). The concentration range in which the substrate is used is 0.001mM-250mM, preferably 0.01mM-100mM and more preferably 0.01mM-10mM.

[0073]

The reagent for PAF-AH activity measurement is preferably a solution, and the substrate of PAF-AH selects stable pH for the respective substrate, and preferably is dissolved in buffer liquid of pH ca. 3 to ca. 9 (for example, HEPES buffer liquid, citrate buffer liquid, tartaric acid buffer liquid, phosphate buffer, acetate buffer, Tris buffer, borate buffer, Good's buffer, etc.)

[0074]

30 Also, the reagent for the PAF-AH activity measurement of the present invention preferably includes nonspecific reaction inhibitor, mentioned above. There is no restriction particularly for the concentration of nonspecific reaction inhibitor when the inhibitor does not inhibit PAF-AH, but when it inhibits PAF-AH, the concentration that does not inhibit PAF-AH should be determined in advance and less than this concentration can be used.

[0075]

40 The reagent for the PAF-AH activity measurement of the present invention may include water miscible organic solvent other than these components, depending on the necessity, in order to dissolve the substrate of PAF-AH: water miscible organic solvent, alcohols (for example, methanol, ethanol, propyl alcohol, n-isopropyl alcohol), ketones (for example, acetone, methyl isobutyl ketone), and esters (for example, methyl and ethyl acetates, propyl acetate, methyl propionate) can be listed. Water miscible organic solvents, in order not to influence PAF-AH activity, are preferably based on the last weight of the solution, should contain less than about 30% by weight, and preferably less than about 20% by weight.

[0076]

50 The reagent PAF-AH activity measurement may contain the substance that promotes dissociation of color-forming or fluorescence color-forming compounds. As for the substance, α -cyclodextrin, β -cyclodextrin γ -cyclodextrin or cyclodextrins to which basic function is introduced to these cyclodextrins (as example, quaternary ammonium salt such as diethylaminoethyl, dimethylaminoethyl, or trimethyl aminoethyl) can be listed. It is alright if these compounds are contained at ca. 0.5%.

[0077]

Moreover, a co-existing chelating reagent is preferable for PAF-AH activity measurement of the present invention. Co-existence of chelating agent enables control of the decomposition reaction that is caused by allylesterase or phospholipase A_2 , which has dependency on Ca^{2+} , of the substrate used in the present invention, making it possible to measure PAF-AH activity specifically. An appropriate chelating agent such as EDTA or EGTA may be used as this chelating agent. It is appropriate when the chelating agent contained is ca. 20mM.

[0078]

Furthermore, the reagent for the PAF-AH activity measurement of the present invention may contain those used generally for activity measurement of enzymes such as buffer, stabilizer, activating agent, diluting agent other than the above.

[0079]

10 Though details will be described later, HDL associated-PAF-AH activity, LDL associated-PAF-AH activity, and total serotype PAF-AH activity can be respectively measured in this present invention. In order to measure HDL associated-PAF-AH activity, in the reagent for the PAF-AH activity measurement of the present invention, as the substance to aggregate LDL, ionic compounds such as anionic compounds (for example, dextran sulfate, cyclodextrins sulfate, sulfated oligosaccharides heparin, heparan sulfate, phosphotungstic acid, etc.), cations such as Mg^{2+} , Mn^{2+} , and polyclonal antibodies or monoclonal antibody (for example, antiapolipoprotein B antibody, etc.) may be included in proper quantity.

[0080]

20 Also, for fractional determination of LDL associated-PAF-AH, in the reagent for the PAF-AH activity measurement of the present invention, polyclonal antibodies or monoclonal antibody (antiapolipoprotein A antibody, antiapolipoprotein E antibody, etc.) can be included, as the substance to aggregate HDL, in proper quantity.

[0081]

(Measurement of PAF-AH activity)

The measurement method of the present invention is the method of qualitative and quantitative measurement by adding the sample possessing (considered to be possessing) PAF-AH activity to the reagent for PAF-AH activity measurement prepared above and allowing them to react and thereby measuring the absorbance values and excited fluorescence of the freed color-forming or fluorescence compounds.

[0082]

30 As the sample to measure PAF-AH activity, blood, serum, and plasma, or bodily fluids such as urine or amniotic fluid of human and animals and cells, organs or extraction liquid of cells and organs of human and animals are used. The test sample that includes PAF-AH such as PAF-AH refined product and serum and plasma, etc. is diluted appropriately with pH 6 to 9 buffer liquid (for example, HEPES buffer liquid, Tris buffer, phosphate buffer, borate buffer, Good's buffer, etc.), maintained in 20-40°C, and used for measurement reaction. Add NaCl, KCl or similar to make the appropriate chlorine concentration for these buffer liquids.

[0083]

40 In the activity measurement method of PAF-AH of the present invention, measure the quantity of chromogenic or fluorescence which is freed by hydrolysis of the substrate. Perform quantitative determination by measuring the light absorption. The measurement may be performed by either the End Method or the Rate Method. In case of the End Method, it is necessary to measure the specimen material blank by first allowing the measurement reagent without substrate and the sample to react. In case of the Rate Method, it is appropriate if the measurement of the light absorption is performed within the time that the measurement can be made quantitatively. Furthermore, calculation of the activity value for PAF-AH may be performed with the molar absorption coefficient of the freed chromogenic or fluorescence compound.

[0084]

50 Also, in the activity measurement method of PAF-AH of the present invention, a manual method or an automated analyzer can be used. Measure the absorbance change of chromogenic or fluorescence of the compound which is freed from the substrate. For example, PAF-AH activity can be calculated accurately with absorbance change in the wavelength 280-560nm in case of the color-forming compounds, and in the case of the fluorescence color-forming compounds, with spectroscopic detection by exciting the fluorescence with the irradiation of laser light and with the calculation of absorbance change per unit time (so-called rate assay method).

[0085]

For example, 4-nitrophenol is generated when using 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl succinyl)-sn-glycerol-phosphocholine for the substrate with the carbon number of A as 2 in the general formula (I) of the present invention. At this time, absorbance at 405nm, which is the absorbance wavelength of 4-nitrophenol, increases quantitatively with the increase of 4-nitrophenol, and the rate of increase or amount of increase of absorbance at 405nm is calculated.

[0086]

Furthermore, by using the activity measurement method of PAF-AH of the present invention, HDL associated-PAF-AH activity, LDL associated-PAF-AH activity, and total serotype PAF-AH activity are fractionated and can be accurately measured respectively. By using the measurement reagent that contains the substance that aggregates LDL; LDL is aggregated, removed, and HDL associated-PAF-AH can be quantified. Also, by using the measurement reagent that contains the substance that aggregates HDL; HDL is aggregated, removed, and LDL associated-PAF-AH can be quantified. If either of these is not added, the total serotype PAF-AH activity is measured.

[0087]

The concrete measurement method is discussed below. First, the inhibitor reagent that contains the inhibitor dissolved in appropriate buffer (for example, 50mM HEPES buffer liquid [pH7.4] that contains inhibitor and 150M NaCl) and substrate solution (for example, 16% ethanol, 50mM HEPES buffer liquid [pH7.4] that contains substrate and 150M NaCl) are prepared. After an appropriate amount of human pooled serum or PAF-AH refined product solution is mixed with inhibitor solution, this is added to the substrate solution and reacted. The pH of the reaction is preferably ca. 6.5 to ca. 8.0, and most preferable is ca. 7.4. Reaction temperature is 20°C to 40°C, and preferably 37°C. After adding the substrate solution, absorbance is measured for an appropriate time (for example, from 2 minutes to 5 minutes), the change quantity of absorbance per unit of time is calculated, and PAF-AH activity value (nmol/min/sample 1 ml) is calculated from the molar absorption coefficient of color-forming compounds and fluorescence color-forming compounds.

[0088]

Also, when measuring automatically by the Rate method, prepare the above inhibitor solution and substrate solution. For example, measure in accordance with the measurement parameters using the H-7170 model automatic analyzer (HITACHI). Mix human pooled serum or PAF-AH refined product with inhibitor solution, then mix substrate solution after a fixed period of time, and the reaction is started. Monitor the absorbance change (time course) at this time and calculate the change quantity of absorbance per unit of time (1 minute) from 2 minutes to 5 minutes after the start of reaction. From the change quantity of absorbance (ΔE_s) per unit of time obtained from the sample, the change quantity of absorbance (ΔE_B) per unit of time obtained by adding the distilled water instead of sample, and the molar absorption coefficient (ϵ) of color-forming compounds and the fluorescence color-forming compounds in reaction solution, the PAF-AH activity value of respective serum sample is calculated by the formula below.

[0089]

[Formula 1]

$$\text{PAF-AH (nmol/min/ml)} = \frac{(\Delta E_s - \Delta E_B) \times \text{Final volume of reaction mixture} \times 10^6}{\epsilon \times \text{Sample quantity} \times \text{Layer length}}$$

[0090]

(PAF-AH activity measurement kit)

The PAF-AH activity measurement kit of this present invention contains the substrate, and depending on the necessity, nonspecific reaction inhibitor, and the above reagent for PAF-AH activity with other additives added. The kit can be, for example, ampoule form that contains reagent for PAF-AH activity measurement, the form with the specified amount of reagent for PAF-AH activity measurement is injected into the well, or the form that includes the container containing the reagent for PAF-AH activity measurement and the well for measurement. By adding serum sample to the reagent for PAF-AH activity measurement attached to the kit of these forms, PAF-AH activity is measured.

[0091]

Moreover, the kit for PAF-AH activity measurement of the present invention, it is appropriate that the test strip is dried after immersion in the reagent when the reagent is a liquid. PAF-AH activity may be qualitatively confirmed by immersion of this in serum. Moreover, the approximate activity may be known using the color comparison chart. Therefore, this type of test strip is also included in the container.

[0092]

10 Further, the kit of the present invention, the substrate represented by the above described formula (I), and does not inhibit PAF-AH, but the solution contains inhibitor (non-specific reaction inhibitor) inhibiting the other ester cleaving related substances and are variously filled in independent containers and it is appropriate if these are mixed when using. In this case, it is appropriate when the substrate is a solution or dissolves in solvent, and it is appropriate when the solution to dissolve the substrate and/or solvent is separately and independently included in the container. It is better to decide the form of the substrate by considering such matters as the stability, operability, and consumption of the substrate when selecting which form.

[0093]

20 Further, in addition to other than such as the substrate described above, utensils for absorbance measurement and the analyzer can also be included in the kit.

[0094]

[Embodiment]

Hereinafter, a concrete explanation of the present invention will be made based upon the embodiments, but the present invention shall not be limited to these embodiments.

[0095]

(Embodiment 1: Manufacture of Substrate)

30 The manufacturing examples of chemical compounds No. 1 through 25 are presented below.

[0096]

(Chemical compound No. 1: Synthesis of 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)

1-octanoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 340mg (0.68mmol) was dissolved in dichloromethane (dehydrated) 3ml, after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 800μl (1.6mmol), and stirred for 2.5 hours at room temperature. After concentrating under reduced pressure, dissolve in chloromethane (dehydrated) 3ml stirring at room temperature and 4-nitrophenol 104 mg (0.75 mmol) and triethylamine 138μl (1.36 mmol) was added to the solution of dichloromethane (dehydrated) 3ml. This was stirred for 2.5 hours and concentrated under reduced pressure. Chloroform: Methanol (2:1) 60 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, concentrate the filtrate after drying with anhydrous sodium sulfate, add diethyl ether causing white turbidity and allow standing overnight. Take the supernatant, perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system, and yellow oil 218mg (52%) is obtained.

40

[0097]

(Chemical compound No. 2: Synthesis of 1-decanoyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)

1-decanol-2-glutaryl phosphatidylcholine 272mg (0.55mmol) was dissolved in dichloromethane (dehydrated) 3ml, and stirred for 2.5 hours at room temperature after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 550μl (1.1mmol). After concentrating, dissolve in chloromethane (dehydrated) 3ml stirring at room temperature and 4-nitrophenol 84 mg (0.6 mmol) and triethylamine 101μl (1.1 mmol) was added to the dichloromethane (dehydrated) 3ml. This was stirred for 2.5 hours and concentrated under reduced pressure. Chloroform: Methanol (2:1) 60 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain yellow amorphous crystals 114mg (32%).

50

[0098]

(Chemical compound No. 3: Synthesis of 1-lauroyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)

1-lauryl-2-glutaryl phosphatidylcholine 290mg (0.52mmol) was dissolved in dichloromethane (dehydrated) 3ml, and after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 520 μ l (1.04mmol) was stirred for 1.5 hours at room temperature. After concentrating under reduced pressure, dissolve in dichloromethane (dehydrated) 3ml, stirring at room temperature, and 4-nitrophenol 79 mg (0.57 mmol) and triethylamine 115 μ l (1.04 mmol) was added to the solution of dichloromethane (dehydrated) 3ml. This was stirred for 2.5 hours and concentrated under reduced pressure. Chloroform: Methanol (2:1) 60 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain subject fraction 171mg (49%).

10

[0099]

(Chemical compound No. 4: Synthesis of 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)

1-myristoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 283mg (0.49mmol) was dissolved in chloroform (dehydrated) 3ml, and stirred for 1.5 hours at room temperature after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 490 μ l (0.98mmol). After concentrating under reduced pressure, dissolve in chloroform (dehydrated) 3ml stirring at room temperature and add 4-nitrophenol 102.1 mg (0.74 mmol) and triethylamine 137 μ l (0.98 mmol) was added to the solution of chloromethane (dehydrated) 3ml. Stirred for 2 hours at room temperature, then 0.1 normal HCl (1m) was added. Chloroform: Methanol (2:1) 75 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain yellow amorphous 182mg (53%).

20

[0100]

NMR (CDCl_3) : 0.89(t,3H,J=7.0Hz) , 1.25(s,20H), 1.50-1.65(m,2H), 1.95-2.12 (m,2H), 2.29(t,2H,J=7.7 Hz), 2.40-2.55(m,2H), 2.71(t,2H,J=7.3 Hz) , 3.38(s,9H), 3.80(br,2H), 3.92-4.05(m,2H), 4.10-4.20(m,1H), 4.25-4.45(m,3H), 5.15-5.30(m,1H), 7.31(d,2H), 8.29(d,2H) ; MS(SIMS) : 703(MH⁺)

30

[0101]

(Chemical compound No. 4: Synthesis of 1-oleoyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)
1-oleoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 350mg (0.55mmol) was dissolved in dichloromethane (dehydrated) 3ml, and after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 550 μ l (1.1mmol) was stirred for 1.5 hours at room temperature. After concentrating under reduced pressure, dissolve in dichloromethane (dehydrated) 3ml stirring at room temperature and 4-nitrophenol 84 mg (0.61 mmol) and triethylamine 153 μ l (1.1 mmol) was added to the solution of dichloromethane (dehydrated) 3ml. This was stirred for 2.5 hours and concentrated under reduced pressure. Chloroform: Methanol (2:1) 60 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain the object fraction 303mg (73%).

40

[0102]

(Chemical compound No. 6: Synthesis of 1-alkyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)
1-alkyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 267 mg (0.45mmol) was dissolved in dichloromethane (dehydrated) 3ml, and after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 450 μ l (0.9mmol), was stirred for 1.5 hours at room temperature. After concentrating under reduced pressure under reduced pressure, dissolve in chloromethane (dehydrated) 3ml, stirring at room temperature and add 4-nitrophenol 69 mg (0.5 mmol) and triethylamine 125 μ l (1.04 mmol) to the solution of dichloromethane (dehydrated) 3ml. This was stirred for 2.5 hours and concentrated under reduced pressure. Chloroform: Methanol (2:1) 60 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain yellow amorphous crystals 146mg (45%).

50

[0103]

(Chemical compound No. 7: Synthesis of 1-alkenyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)
A yellow amorphous crystal 98mg (60%) was obtained performing the synthesis in the same manner as for compound 6.

[0104]

(Chemical compound No. 8: Synthesis of 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl succinyl)-sn-glycero-phosphocholine)

10 1-myristoyl-2-succinylphosphatidylcholine 200mg (0.35mmol) was dissolved in dichloromethane (dehydrated) 3ml, and stirred for 1.5 hours at room temperature after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 350μl (0.71mmol). After concentrating under reduced pressure, dissolve in dichloromethane (dehydrated) 3ml stirring at room temperature and 4-nitrophenol 154 mg (0.39 mmol) and triethylamine 115μl (1.04 mmol) was added to the solution of dichloromethane (dehydrated) 3ml. This was stirred for 1.5 hours at room temperature. Chloroform: Methanol (2:1) 60 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain pale yellow oil 229mg (64%).

[0105]

NMR (CDCl₃) : 0.80-0.95(m,3H), 1.26(br,20H), 1.57(br,2H), 2.22-2.29(m,2H), 2.75-2.82(m,2H), 2.82-2.93(m,2H), 3.34(s,9H), 3.79(br,2H) , 4.01(br,2H) , 4.10-4.22(m,1H), 4.22-4.48(m,4H), 5.27(br,1H), 7.30-7.36(m,2H), 8.27-8.32(m,2H) ; MS(SIMS) : 689(MH⁺)

20 [0106]

(Chemical compound No. 9: Synthesis of 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyladipoyl)-sn-glycero-phosphocholine)
Yellow oil 167mg (52%) was obtained performing the synthesis in the same manner as for compound 8.

[0107]

(Chemical compound No. 10: Synthesis of 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl pimeloyl)-sn-glycero-phosphocholine)

Yellow oil 341 mg (82%) was obtained performing the synthesis in the same manner as for compound 8.

[0108]

30 (Chemical compound No. 11: Synthesis of 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl suberoyl)-sn-glycero-phosphocholine)

Yellow oil 114 mg (34%) was obtained performing the synthesis in the same manner as for compound 8.

[0109]

(Chemical compound No. 12: Synthesis of 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl azeloyl)-sn-glycero-phosphocholine)

Yellow oil 190 mg (76%) was obtained performing the synthesis in the same manner as for compound 8.

[0110]

40 NMR (CDCl₃) : 0.89(m,3H) , 1.20-1.50(m,26H) , 1.60(br,4H) , 1.70-1.85(m,2H), 2.30(m,4H), 2.61(t,2H,J=7.46 Hz), 3.38(s,9H), 3.83(br,2H), 3.90-4.02(m,2H), 4.10-4.22(m,1H), 4.25-4.50(m,3H), 5.23(br,1H) , 7.21-7.35(m,2H) , 8.20-8.35(m,2H).

[0111]

(Chemical compound No. 13: Synthesis of 1-myristoyl-2-(2-chloro-4- nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)

50 1-myristoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 177mg (0.3mmol) was dissolved in dichloromethane (dehydrated) 3ml, and stirred for 2 hours at room temperature after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 300μl (0.6mmol). After concentrating under reduced pressure, dissolve in dichloromethane (dehydrated) 3ml, while stirring at room temperature and 2-chloro-4-nitrophenol 104 mg (0.6 mmol) and triethylamine 84μl (0.6 mmol) was added to the solution of dichloromethane (dehydrated) 3ml. This was stirred for 3 days at room temperature and then concentrated under reduced pressure. Chloroform: Methanol (2:1) 60 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain pale yellow oil 156mg (71%).

[0112]

(Chemical compound No. 14: Synthesis of 1-myristoyl-2-[(4-methy) coumaryl glutaryl]-sn-glycero-phosphocholine)

1-myristoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 191mg (0.33mmol) was dissolved in dichloromethane (dehydrated) 3ml, and stirred for 1.5 hours at room temperature after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 328 μ l (0.67mmol). After concentrating under reduced pressure, dissolve in dichloromethane (dehydrated) 3ml, stirring at room temperature, and 4-nitrophenol 115 mg (0.67 mmol) and triethylamine 91.4 μ l (0.67 mmol) was added to the solution of dichloromethane (dehydrated) 3ml. This was stirred for 4 days at room temperature and then concentrated under reduced pressure. Chloroform: Methanol (2:1) 60 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain colorless amorphous substance 183.2mg (76.5%).

[0113]

NMR (CDCl_3) : 0.89(t,3H,J=6.9 Hz), 1.25(br,20H), 1.50-1.65(m,2H), 1.95-2.12(m,2H), 2.29(t,2H,J=7.7 Hz), 2.44 (s,3H), 2.47-2.51(m,2H), 2.70(t,2H,J=7.2 Hz), 3.38(s,9H), 3.82(br,2H), 3.98-4.03(m,2H) , 4.11-4.22(m,1H), 4.30-4.48(m,3H), 5.19-5.32 (m,1H), 6.27(s,1H), 7.00-7.11(m,1H), 7.11-7.20(m,1H), 7.58-7.70(m,1H) ; MS(SIMS) : 726(MH+).

[0114]

(Chemical compound No. 15: Synthesis of 1-myristoyl-2-(2-fluoro-4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)

1-myristoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 266mg (0.46mmol) was dissolved in chloroform (dehydrated) 3ml, and stirred for 1.5 hours at room temperature after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 457 μ l (0.91mmol). After concentrating under reduced pressure, dissolve in chloromethane (dehydrated) 3ml, stirring at room temperature and 4-nitrophenol 102.1 mg (0.74 mmol) and triethylamine 137 μ l (0.98 mmol) was added to the solution of chloromethane (dehydrated) 3ml. Stirred for 3 hours at room temperature, then 0.1 normal HCl (1m) was added. Chloroform: Methanol (2:1) 70 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain yellow amorphous substance 260mg (79%).

[0115]

(Chemical compound No. 16: Synthesis of 1-myristoyl-2-(3-fluoro-4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)

Yellow amorphous crystals 171mg (62%) were obtained performing the synthesis in the same manner as for compound 15.

[0116]

(Chemical compound No. 17: Synthesis of 1-myristoyl-2-(4-nitro-thiophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)

1-myristoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 227mg (0.39mmol) was dissolved in chloroform (dehydrated) 3ml, and stirred for 1.5 hours at room temperature after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 390 μ l (0.78mmol). After concentrating under reduced pressure, dissolve in chloromethane (dehydrated) 3ml stirring at room temperature and add 4-nitrophenol 90.8 mg (0.59 mmol) and triethylamine 108.3 μ l (0.78 mmol) was added to the solution of chloromethane (dehydrated) 3ml. Stirred for 2 hours at room temperature, then 0.1 normal HCl (1m) was added. Chloroform: Methanol (2:1) 70 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain brown oil 202mg (72%).

[0117]

NMR (CDCl_3) : 0.80-0.98(m,3H), 1.27(br,20H), 1.59(br,2H) , 1.92-2.12(m,2H), 2.20-2.35(m,2H), 2.35-2.52(m,2H), 2.70-2.88(m,2H), 3.37(s,9H), 3.82(br,2H), 3.90-4.02(m,2H), 4.02-4.20(m,1H), 4.22-4.47(m,3H), 5.22(br,1H), 7.51-7.65(m,2H), 8.15-8.31(m,2H) ; MS(SIMS) : 719(MH+).

[0118]

(Chemical compound No. 18: Synthesis of 1-myristoyl-2-(5-indolyl- oxy-glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)

1-myristoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 205mg (0.35mmol) was dissolved in chloroform (dehydrated) 3ml, and stirred for 1.5 hours at room temperature after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 352μl (0.7mmol). After concentrating under reduced pressure, dissolve in chloromethane (dehydrated) 3ml, stirring at room temperature, and add 5-hydroxy indole 70.4 mg (0.53 mmol) and triethylamine 98.2μl (0.7 mmol) was added to the solution of chloromethane (dehydrated) 3ml. Stirred for 2 hours at room temperature, then 0.1 normal HCl (1m) was added. Chloroform: Methanol (2:1) 70 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain yellow oil 143mg (59%).

[0119]

NMR (CDCl₃) : 0.80-1.00(m,3H), 1.20-1.40(m,20H), 1.50-1.65(m,2H), 1.91-2.15(m,2H), 2.18-2.35(m,2H), 2.35-2.51(m,2H), 2.51-2.70(m,2H), 2.78(s,9H), 3.00-3.29(m,3H), 3.89-4.27(m,5H), 4.27-4.50(m,1H), 5.21(br,1H), 6.41(s,1H), 6.70-6.90(m,1H), 7.21(s,1H), 7.40-7.65(m,1H), 11.18(s,1H) ; MS(SIMS) : 697(MH+).

[0120]

(Chemical compound No. 19: Synthesis of 1-myristoyl-2-(2, 6-diphenyl-4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero-phosphocholine)

1-myristoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 254mg (0.44mmol) was dissolved in chloroform (dehydrated) 3ml, and stirred for 1.5 hours at room temperature after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 437μl (0.87mmol). After concentrating under reduced pressure, dissolve in chloroform (dehydrated) 3ml, stirring at room temperature and add 2,6-diphenyl-4-nitrophenol 191 mg (0.65 mmol) and triethylamine 122μl (0.98 mmol) was added to the solution of chloroform (dehydrated) 3ml. Stirred for 16 hours at room temperature, then 0.1 normal HCl (1m) was added. Chloroform: Methanol (2:1) 70 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain yellow oil 219mg (58%).

[0121]

NMR (CDCl₃) : 0.89(t,3H,J=7.2 Hz), 1.26(br,20H), 1.26-1.61(m,4H), 1.91(t,2H,J=7.6 Hz), 2.14(t,2H,J=7.1 Hz), 2.26(t,2H,J=7.8 Hz), 3.31(s,9H), 3.74(br,2H), 3.92(t,2H,J=6.0 Hz), 4.00-4.15(m,1H), 4.28(br,2H), 4.30-4.42(m,1H), 5.14(br,1H), 7.32-7.50(m,10H), 8.28(s,2H) ; MS(SIMS) : 855(MH+).

[0122]

(Chemical compound No. 20: Synthesis of (Chemical compound No. 9: Synthesis of 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl glycolyl)-sn-glycero-phosphocholine)

1-myristoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 164mg (0.28mmol) was dissolved in chloroform (dehydrated) 3ml, and stirred for 2 hours at room temperature after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 281μl (0.56mmol). After concentrating under reduced pressure, dissolve in chloroform (dehydrated) 3ml, stirring at room temperature and add 4-nitrophenol 43.0 mg (0.31 mmol) and triethylamine 78μl (0.56 mmol) was added to the solution of chloroform (dehydrated) 3ml. Stirred for 2 hours at room temperature, then 0.1 normal HCl (1m) was added. Chloroform: Methanol (2:1) 56 ml was added to this solution and washed with water (14ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain yellow oil 102mg (51%).

[0123]

(Chemical compound No. 21: Synthesis of 1-myristoyl-2-[5-dimethylamino-2-(2-thiazolylazo) phenyl succinyl]-sn-glycero- phosphocholine)

1-myristoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 419 mg (0.74 mmol) was dissolved in chloroform (dehydrated) 3ml, and stirred for 2 hours at room temperature after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 738 μ l (1.48 mmol). After concentrating under reduced pressure, dissolve in chloroform (dehydrated) 3ml, stirring at room temperature and add 5-dimethylamino-2-(2-thiazolylazo) phenol 202 mg (0.81 mmol) and triethylamine 206 μ l (1.48 mmol) was added to the solution of chloroform (dehydrated) 3ml. Stirred for 2 hours at room temperature, then 0.1 normal HCl (2ml) was added. Chloroform: Methanol (2:1) 150 ml was added to this solution and washed with water (15ml). Take the lower layer, after drying with anhydrous sodium sulfate, concentrate the filtrate, and perform silica gel column purification of the residue with a chloroform-methanol-water system to obtain red oil 247mg (42%).

10

[0124]

(Chemical compound No. 22: Synthesis of 1-myristoyl-2-[1-(2- triazolylazo)-2- naphthyl succinyl]-sn-glycero-phosphocholine)

Reddish-brown oil 64mg (14%) was obtained performing the synthesis in the same manner as for compound 21.

20

[0125]

(Chemical compound No. 23: Synthesis of 1-myristoyl-2-[(4-nitrophenyl) dimethyl succinyl]-sn-glycero-phosphocholine)

White amorphous crystals 150mg (49%) were obtained performing the synthesis in the same manner as for compound 21.

[0126]

(Chemical compound No. 24: Synthesis of 1-myristoyl-2-[(1-(2-triazolylazo) succinyl]-sn-glycero-phosphocholine)

White amorphous crystals 295mg (68%) were obtained performing the synthesis in the same manner as for compound 21.

30

[0127]

NMR (CDCl₃) : 0.87(t,3H,J=6.9 Hz), 1.24(br,20H), 1.46-1.64(m,2H), 2.25(t,2H,J=7.7 Hz), 2.65-3.09(m,6H), 3.33(s,9H), 3.78(br,2H), 4.00(t,2H,J=6.7Hz), 4.09-4.20(m,1H), 4.23-4.43(m,3H), 5.17-5.31(m,1H), 5.41-5.56(m,1H), 7.10-7.65(m,8H).

[0128]

(Chemical compound No. 25: Synthesis of 1-palmitoyl-2-(4-nitrophenyl succinyl)-sn-glycero-phosphocholine)

40

1-palmitoyl-2-glutaryl phosphatidylcholine 320 mg (0.5mmol) was dissolved in dichloromethane (dehydrated) 3ml, and after addition of ice-cold 2M oxalyl chloride 765 μ l (1.53 mmol) was stirred for 1.5 hours at room temperature. After concentrating under reduced pressure, dissolve in dichloromethane (dehydrated) 3ml, stirring at room temperature, and 4-nitrophenol 104 mg (0.75 mmol) and triethylamine 139 μ l (1.02 mmol) was added to the solution of dichloromethane (dehydrated) 3ml. This was stirred for 2.5 hours and concentrated under reduced pressure. Chloroform: Methanol (2 : 1) 75ml was added to this and washed with water (15ml). Take the lower layer and concentrate the filtrate after drying with anhydrous sodium sulfate. Perform silica gel column purification (methanol) of the residue to obtain yellow amorphous material 203.6 mg (55%).

50

[0129]

(Embodiment 2: Measurement of PAF-AH Activity; Substrate Specificity)

(Purification example of enzyme PAF-AH)

Prepare human blood plasma with KBr for specific gravity d=1.063, separate by centrifuge to obtain the fractions including chylomicron, VLDL, and LDL. After dialysis with 50 mM Tris-hydrochloric acid Tris-HCl buffer solution (pH7.4) containing 10mM CHAPS, the buffer solution was attached to a Q sepharose column equilibrated in advance with 50 mM Tris-hydrochloric acid -HCl buffer solution (pH7.4) containing 10 mM CHAPS. After the column is washed with the same buffer liquid, it is eluted by linear gradient elution of NaCl (0-0.5M). Then attached to Sephacryl S-200 equilibrated with 10 mM CHAPS, 50

mM Tris- HCl buffer liquid (pH7.4) containing 0.3M NaCl. The eluted PAF-AH activity fraction was concentrated with Centrip 30. The PAF-AH activity fraction that was eluted with the same buffer solution was concentrated with Centrip 30 and also then attached to a Blue Sepharose column equilibrated with 25mM Tris-HCl buffer solution (pH 7.4) containing 10 mM CHAPS, 0.3 M NaCl. After washing with the same buffer liquid, it is eluted with 10 mM CHAPS, 50mM Tris-HCl buffer liquid (pH8.0). Refined PAF-AH is made by concentrating under reduced pressure the PAF-AH activity fraction with Centrip 30.

10

0130]

(Measurement of Activity)

PAF-AH Activity was measured in regard to the above described synthesized compounds numbered 1 to 13, 15 to 17, 20 and 25.

The solution hereinafter, Buffer liquid: is prepared from 50 mM HEPES buffer liquid containing 150 mM NaCl, 10 mM EDTA; and, Substrate liquid: is prepared from 30 mM HEPES buffer liquid containing 4 mM of substrate, 90 mM NaCl, 6mM EDTA, and 40% ethanol.

20

[0131]

PAF-AH refined product obtained by the above described method was mixed with buffer liquid 900 μ l, after allowing standing 5 minutes in a 37°C temperature bath, add substrate solution 100 μ l, and the reaction is started. Substrate liquid the PAF-AH activity value (nmol/min/sample 1 ml) after adding the substrate solution, is calculated from the amount of change (ΔE) in absorbance per unit time (1 minute) proceeding from the second minute to the fifth minute and from the molar absorption coefficient for para-nitrophenol ϵ =12,000 (however, using the molar absorption coefficient ϵ =18,000 for the compounds of compound number 13, 15, and 16).

The results are shown in Table 1.

30 In the formula, the value is measured adding ΔEB for the purified water in place of the specimen.

[0132]

[Table 1]

Substrate (compound no.)	Activity value
1	8 3
2	9 8
3	1 3 3
4	1 1 1
5	5 5
6	4 8
7	6 2
8	4 5 7
9	1 2 3
1 0	5 0
1 1	3 7
1 2	1 7
1 3	6 2
1 5	6 7
1 6	7 8
1 7	4 4
2 0	2 6 5
2 5	7 7

[0133]

From this result, the highest substrate specificity became known for 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl succinyl)-sn-glycero-phosphocholine (A=2 in general formula (I)) of compound No. 8. This, is more than
 10 the 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl glutaryl)-sn-glycero- phosphocholine (A=3 in general formula (I)) of the commonly used compound No.4 and is displaying a high substrate specificity of more than 4-fold.

[0134]

The PAF-AH activity was detected also for compounds of A=4 to 7 in general formula (I) (compound number 9 through 12), but the trend is activity is high with smaller A. Moreover, activity was detected for the case of (compound no. 1 through 5, and 25) carbon atoms are 8 to 18 for the acyl group (R1) in general formula (I). Moreover, activity was detected for the case of (compounds no. 6 and 7) where R1 is acyl
 20 group or alkenyl group. R1 did not impart a significant influence on the activity. Further, (substrate no. 13, 15, and 16) were shown to be useful also for substrate freeing of halogen substituted nitrophenyl compounds.

[0135]

Hereinafter, the substrate specificity is high (chemical compound No. 8: 1-myristoyl-2-(4-nitrophenyl succinyl)-sn-glycero-phosphocholine, hereinafter referred to as substrate of the present invention) and is used to depict embodiments.

[0136]

(Embodiment 3: Measurement of PAF-AH activity; Effect of Inhibitor)

Hereafter, the various inhibitor solutions and substrate solutions are prepared.

30 Inhibitor liquid: The inhibitor described in Table 2 is dissolved to the concentration described in Table 2, 50 mM HEPES buffer liquid (pH7.4) including NaCl 150 mM.

Substrate liquid: 4mM of the substrate of the present invention, 40% ethanol and 90 mM NaCl including 30 mM HEPES buffer liquid (pH7.4).

[0137]

Mix human pool serum or PAF-AH refined product 10μl and inhibitor solution 900μl, after allowing to stand 5 minutes in a 37°C temperature bath, add substrate solution 100μl, and the reaction is started.

40 The PAF-AH activity value (nmol/min/sample 1 ml) is calculated, after adding in the substrate solution, from the amount of change(ΔE) in absorbance per unit time (1 minute) proceeding from the second minute to the fifth minute and the molar absorbance coefficient $\epsilon = 12,000$ of para-nitrophenol.

The results are shown in Table 2.

[0138]

[Table 2]

	Human pool blood serum		PAF-AH refined product	
	Activity value	Relative activity	Activity value	Relative activity
None	389	100	256	100
Sodium lauryl sulfate (1mM)	267	69	208	81
Sodium decane sulfonate (2.5mM)	289	74	244	95
Triton X-100 (0.05%)	342	88	247	96
Tween-20 (0.05%)	294	76	239	93
CHAPS (5mM)	347	89	264	103
Sodium cholate	347	89	250	98
Sodium lauryl sulfate (1mM)				
+Triton X-100 (0.05%)	225	58	200	78

Sodium lauryl sulfate (1mM)

+CHAPS (5mM)

269

69

247

96

[0139]

In the presence of each inhibitor type, a significant difference was observed in the level of the inhibitor with the blood pooled serum and PAF-AH refined product. Namely, PAF-AH refined product retains nearly more than 90% of activity (small decrease in activity depending on the inhibitor) and in contrast, the activity is not retained above 90% in the human pooled serum. This suggests that considering with the refined result for the PAF-AH refined product, the contained amount of the material that generates non-specific hydrolysis reaction is small, and the relative activity is difficult to lower by inhibitor, while many substances that generate non-specific hydrolysis reaction are contained in human pooled serum, and as a result of the non-specific hydrolysis activity being constrained by inhibitor, the relative activity was lowered.

[0140]

(Embodiment 4: Measurement of PAF-AH Activity: Correlation with Conventional Method)

Hereafter, the reagent is prepared.

Reagent A: 150 mM NaCl containing 50mM HEPES buffer liquid (pH7.4).

Reagent 2: Substrate liquid; 1.6mM of the substrate of the present invention, 16% ethanol and 150 mM NaCl including 50 mM HEPES buffer liquid (pH7.4);

Reagent 1 (B): Inhibitor liquid; 50 mM HEPES buffer liquid (pH7.4) including 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1mM Sodium lauryl sulfate, and 5 mM CHAPS; and Reagent 2 (B): Substrate liquid including Inhibitor; 50mM HEPES buffer liquid (pH7.4) including 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1mM Sodium lauryl sulfate, and 5 mM CHAPS, 16% ethanol and 1.6 mM of substrate of the present invention.

Serum specimen: 5 kinds of sample specimen S1, S2, S3, S4, and S5.

[0141]

An H7170 model automatic analyzer (HITACHI) was used in the measurement of PAF-AH activity.

The parameters during measurement are those which follow.

[0142]

[Table 3]

Input item	Input
RATE-A	25-34 POINT
S VOLUME	5 μ l
R1 VOLUME	240 μ l
R2 VOLUME	80 μ l
Wavelength	505-405 nm
K-FACTOR	5417

[0143]

According to the parameters described above, dispense the serum sample 5 μ l and reagent 1(A) (buffer liquid) or 1(B) (inhibitor solution) 240 μ l and mix, after time at constant temperature (37°C, 5 minutes), add in reagent 2(A) (substrate solution) or reagent 2(B) (substrate solution including inhibitor) with mixing and the reaction is started. Drawing 1 and Drawing 2 depict the absorption change (time course) at this time (time course). The reason for the increase of the absorbance value was confirmed in forming 4-nitrophenol

from the substrate of the present invention by reaction between the substrate of the present invention and PAF-AH, when adding solution containing the substrate of the present invention in the solution mixture of sample and reagent 1(A) or 1(B).

[0144]

It is clear in comparing Drawing 1 and Drawing 2, the increase in the absorbance value is inhibited more for (Drawing 2) when inhibitor is present than (Drawing 1) when inhibitor is absent. This also suggests that non-specifically hydrolysis is restricted by the inhibitor.

[0145]

The PAF-AH activity value of each serum sample was calculated, after adding in the substrate (reagent 2(A) or reagent 2(B)), calculating using the amount of change (ΔE) in absorbance per unit time (1 minute) proceeding from the second minute to the fifth minute and the molar adsorption coefficient $\epsilon = 12,000$ for para-nitrophenol.

[0146]

The usefulness of the method of the present invention was confirmed, on the other hand, calculating the human serum PAF-AH activity using the substrate of radio-labeled PAF, which is the conventional method.

[0147]

1-O-octadecyl[octa-9,10-3 H(N)] 2-O-acetyl-sn-glycero-phosphocoline (NEN Company, NET-1009) 5pmole (18.5kBq), 1-O-octadecyl-2-O-acetyl-sn-glycerophosphocoline (BACHEM FEIN CHEMKALIEN AG, O-1355) 34 p mole, and human serum adequate dose (50 to 100 fold dilution, 6.5 to 37.5 μ l, 3 concentration levels for each sample) were made turbid with 100mM Tris-HCl buffer liquid(pH7.4) and 5mM EDTA; and 0.1ml of the entire quantity was incubated for 10 minutes at 37°C. After the reaction completed, lipids were extracted by the method of Bligh & Dryer after the reaction completed. Namely, add chloroform 0.125 ml and methanol 0.25 ml, shake for 2 minutes, next add chloroform 0.125 ml, shake for 30 seconds, and finally, add water, shake for 30 seconds. Afterward, separate by centrifugation (400g, 3 minutes), spot the lower layer (organic layer) 0.04m on the TLC (MERCK, 5554-1M), and this was developed with developer solvent Chloroform: Methanol: Water = 65:35:6. Radioactivity was measured using the bioimage analyzer Mac BAS5000 (Fiji Film). Enzyme activity using the lyso PAF quantity (nmol) generating was measured with the quantity of human serum μ l which is the sample and reaction time (10 minutes), the number of moles of lyso PAF per unit time and unit liquid quantity are found by converting the radioactivity and represented by nmol/min/ml.

[0148]

The correlation of the measurement result (Y) that used the substrate of the present invention and the measurement result that used the radio-labeled PAF, for the case of no inhibitor and the case of inhibitor present are shown in Drawing 3 and in Drawing 4, respectively. In the case of no inhibitor present, the linear regression line of Drawing 3 was $Y=206X+307$, and correlation coefficient $R=0.970$. In the case of inhibitor present, the linear regression line of Drawing 4 was $Y=179X+93.6$, and correlation coefficient $R=0.997$. In this manner, a strong correlation coefficient could be observed in either case, and, an extremely strong correlation coefficient was observed when inhibitor was present, whereby the usefulness of the substrate of the present invention and the measurement method of the present invention were confirmed.

[0149]

([Embodiment 5: Measurement of PAF-AH])

The same as embodiment 4, employing the substrate of the present invention, the PAF-AH activity was measured in normal area pooled serum (product name: Neskoru-x Manufacturer: KAKETSUKEN- the Chemo-Sero Therapeutic Research Institute, Sales and Distribution: Azwell Inc.). Each of these tests was repeated 10 times and the measurement results are presented in Table 4.

10

[0150]
[Table 4]

	(nmol/min/sample 1ml)	
	No inhibitor	Inhibitor present (Method of the present invention)
1	640	348
2	671	329
3	598	348
4	603	346
5	656	344
6	603	336
7	593	336
8	585	332
9	613	344
10	681	329
Average	624	339
Standard deviation	34.8	7.7
C. V. (%)	5.6	2.3

[0151]

20 As shown in table 4, the method of the present invention can be confirmed by the measuring method of PAF-AH activity in well-purified serum.

[0152]

[Effect of the invention]

According to the PAF-AH activity measurement method of the present invention, radio-labeled substrate is not employed, it can be sufficiently utilized in daily examinations as a safe, rapid, and simple measurement method. Moreover, the PAF-AH measurement method of the present invention has shorter measurement time than conventional methods. does not receive any influence from myriad esterase and esterase-like substances, and since it has the benefit of direct measurement of PAF-AH activity by monitoring color-

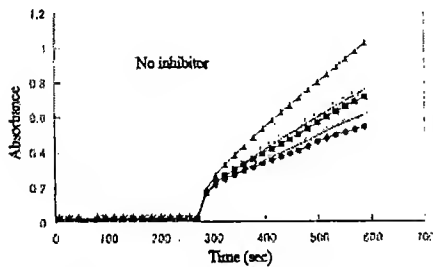
forming compounds, comparing to conventional methods using enzymes and reagents introducing a color system, it is more accurate, and because more rapid measurement is possible, it may be used for short-term diagnosis of progress pre-and post. Consequently, the present invention provides a PAF-AH activity measurement method having extremely high usability.

[Brief description of the Drawings]

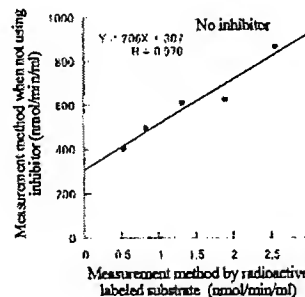
- 10 [Drawing 1] This drawing depicts the time course during the measurement of PAF-AH activity in the sample when there is no inhibitor.
 [Drawing 2] This drawing depicts change in absorbance when the PAF-AH activity is measured in the sample when inhibitor is present.
 [Drawing 3] This depicts the relationship between the measurement method not using inhibitor and the measurement method using a radio-labeled standard substrate.
 [Drawing 4] This depicts the relationship between the measurement method using measurement method (measurement method of the present invention) in the case of employing inhibitor and the measurement method using a radio-labeled substrate.

20

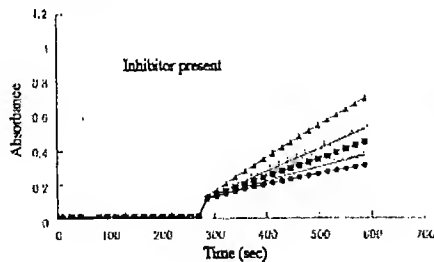
[Drawing 1]



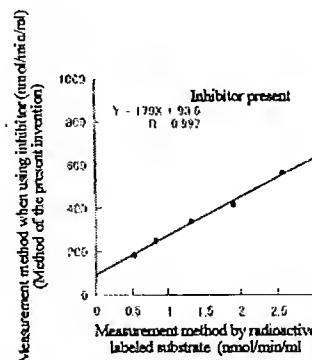
[Drawing 3]



[Drawing 2]



[Drawing 4]



10

Continued from front page

(72)[Inventor]

[Name] Fuzuki Iwakura

[Address or Residence] 2-1-4-201 Nishisakaidani-cho, Oharano, Nishikyo-ku, Kyoto

20 (72)[Inventor]

[Name] Yasuji Muneda

[Address or Residence] 4-5-11 Motoyamakitamachi, Higashinada-ku, Kobe-shi, Hyogo Prefecture

[Patent Examiner] Kenji Miharai

(56)[Reference Documents]

[Literature Citation] Patent publication H04-346797 (JP, A)

[Literature Citation] Patent publication H02-003662 (JP, A)

30 (58)[Examined Field](Int. Cl., DB name)

C12Q 1/00-1/70

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus/EMBASE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第4220603号
(P4220603)

(45) 発行日 平成21年2月4日 (2009. 2. 4)

(24) 登録日 平成20年11月21日 (2008. 11. 21)

(51) Int. Cl.		F 1	
C 1 2 Q	1/26	(2006. 01)	C 1 2 Q 1/26
G O 1 N	21/78	(2006. 01)	G O 1 N 21/78 C
G O 1 N	33/52	(2006. 01)	G O 1 N 33/52 C

請求項の数 23 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願平10-342759	(73) 特許権者	000231394
(22) 出願日	平成10年12月2日 (1998. 12. 2)		アルフレッサファーマ株式会社
(65) 公開番号	特開2002-223794 (P2002-223794A)		大阪府大阪市中央区石町 2 丁目 2 番 9 号
(43) 公開日	平成14年8月13日 (2002. 8. 13)	(74) 代理人	100104673
審査請求日	平成17年11月25日 (2005. 11. 25)		弁理士 南條 博道
		(72) 発明者	山口 誠博
			大阪府茨木市上郡 2 丁目 8 番 2 0 号
		(72) 発明者	小坂 哲也
			大阪府茨木市西河原 1 丁目 1 8 番 6 1 3 号
		(72) 発明者	豊里 満良
			京都府京都市左京区上高野八幡町 6 番地
		(72) 発明者	水野 耕治
			京都府京都市西京区大原野西境谷町 2 丁目 1 番地 4 - 2 0 1

最終頁に続く

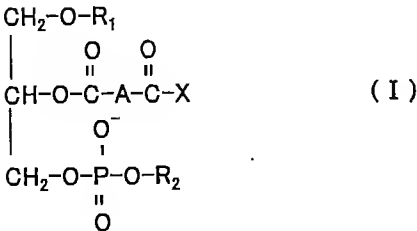
(54) 【発明の名称】 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性の測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性の測定方法であって、該方法は、一般式（I）：

【化 1】



10

（式中、R₁ はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、A は酸素原子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数 2 ～ 7 の炭化水素基を表し、X は遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、R₂ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。）で表される基質と、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ含有試料とを、血小板活性化因子アセ

20

チルヒドロラーゼを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤の存在下、反応させ、それによって遊離する発色性化合物又は蛍光発色性化合物の量を測定することを含み、該血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ含有試料が、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿、羊水、細胞、臓器、又は細胞及び臓器の抽出液であり、該阻害剤が、アニオン性界面活性剤、非イオン界面活性剤、胆汁酸塩及び胆汁酸塩誘導体からなる群から選択される少なくとも1種の阻害剤である、測定方法。

【請求項2】

前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である、請求項1に記載の測定方法。

【請求項3】

さらに、キレート剤を共存させる、請求項1又は2に記載の測定方法。

【請求項4】

前記キレート剤が、EDTA又はEGTAである、請求項3に記載の測定方法。

【請求項5】

前記アニオン性界面活性剤が、アルキル硫酸のアルカリ金属塩又はアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩である、請求項1から4のいずれかに記載の測定方法。

【請求項6】

前記非イオン界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル又はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである、請求項1から4のいずれかに記載の測定方法。

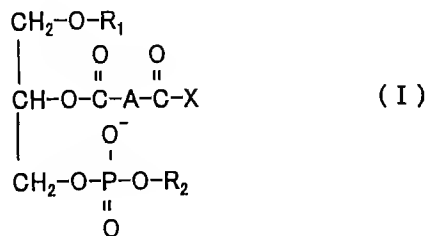
【請求項7】

前記胆汁酸塩及び胆汁酸塩誘導体が、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、デヒドロコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロリトコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム、タウロデヒドロコール酸ナトリウム、CHAPS、CHAPSO、BIGCHAP、又はデオキシ-BIGCHAPである請求項1から4のいずれかに記載の測定方法。

【請求項8】

試料中の血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定用試薬であって、該試薬は、一般式(I)：

【化2】



(式中、R₁はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Aは酸素原子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数2～7の炭化水素基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、R₂はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。)で表される基質と、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤とを含有し、該試料が、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿、羊水、細胞、臓器、又は細胞及び臓器の抽出液であり、該阻害剤が、アニオン性界面活性剤、非イオン界面活性剤、胆汁酸塩及び胆汁酸塩誘導体からなる群から選択される少なくとも1種の阻害剤である、試薬。

【請求項9】

前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である、請求項 8 に記載の試薬。

【請求項 10】

さらに、キレート剤を共存させる、請求項 8 又は 9 に記載の試薬。

【請求項 11】

前記キレート剤が、EDTA 又は EGTA である、請求項 10 に記載の試薬。

【請求項 12】

前記アニオン性界面活性剤が、アルキル硫酸のアルカリ金属塩又はアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩である、請求項 8 から 11 のいずれかに記載の試薬。

【請求項 13】

前記非イオン界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル又はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである、請求項 8 から 11 のいずれかに記載の試薬。

【請求項 14】

前記胆汁酸塩及び胆汁酸塩誘導体が、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、デヒドロコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロリトコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム、タウロデヒドロコール酸ナトリウム、CHAPS、CHAPSO、BIGCHAP、又はデオキシ-BIGCHAP である請求項 8 から 11 のいずれかに記載の試薬。

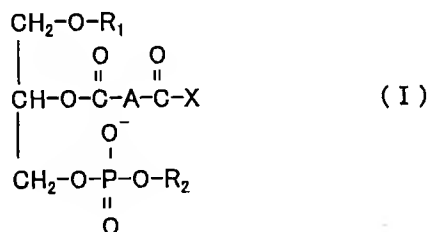
【請求項 15】

請求項 8 から 14 いずれかの項に記載の試薬を含む、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定用キット。

【請求項 16】

試料中の血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定用キットであって、該キットは、一般式 (I) :

【化 3】



(式中、R₁ はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、A は酸素原子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数 2~7 の炭化水素基を表し、X は遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、R₂ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) で表される基質を含む容器と、

血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤及びキレート剤を含有する溶液を含む容器とを有し、

該試料が、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿、羊水、細胞、臓器、又は細胞及び臓器の抽出液であり、該阻害剤が、アニオン性界面活性剤、非イオン界面活性剤、胆汁酸塩及び胆汁酸塩誘導体からなる群から選択される少なくとも 1 種の阻害剤である、

キット。

【請求項 17】

前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

前記基質が、溶液あるいは溶媒中に溶解されている、請求項 16 又は 17 に記載のキット。

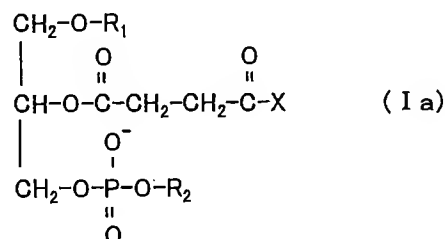
【請求項 19】

さらに、前記基質を溶解するための溶液あるいは溶媒を含有する容器を有する、請求項 15 から 18 のいずれかに記載のキット。

【請求項 20】

一般式 (I a) で表される化合物：

【化 4】



(式中、R₁ は炭素数 6 から 20 のアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、X は遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、R₂ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。)

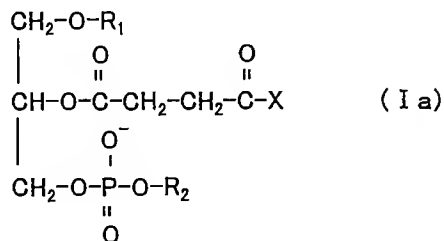
【請求項 21】

前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である、請求項 20 に記載の化合物。

【請求項 22】

血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性の測定方法であって、該方法は、一般式 (I a) で表される化合物：

【化 5】



(式中、R₁ は炭素数 6 から 20 のアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、X は遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、R₂ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) で表される基質と、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ含有試料とを反応させ、それによって遊離する発色性化合物又は蛍光発色性化合物の量を測定することを含み、該血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ含有試料が、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿、羊水、細胞、臓器、又は細胞及び臓器の抽出液である、測定方法。

【請求項 23】

前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である、請求項

10

20

30

40

50

2.2に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床的に重要な血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性を測定する方法、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定用試薬、その試薬を利用する血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定用キットに関する。

【0002】

【従来の技術】

血小板活性化因子 (platelet activating Factor: 1-アルキル-2-アセチル-sn-グリセロール-3-ホスホコリン、以下、PAFと省略する) は、炎症やアレルギー反応等広範囲の各種病態発症に関するメディエーターである。一方、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ (以下、PAF-AHという) は、PAFの持つ強力な生物活性を消去する機能を有しており、生体内PAFレベルを調節し、生体の恒常性維持に関与している。そして、川崎病、全身性エリトマトーデス、溶血性尿毒症症候群等の疾患において、これらの病態の進行に伴い、健康時には認められない血清中のPAF-AH活性の変動が観察されている。

【0003】

このように、血清または血漿中のPAF-AH活性は各種炎症性患者の発症、病態変化を反映しているので、PAF-AH活性の測定は、これらの疾患の診断に有用な情報をもたらす新規な臨床検査法として重要なものである。さらに、血清PAF-AH欠損者が存在し、この酵素欠損が重篤な小児喘息のリスクファクターとみなされており、PAF-AH活性の測定は予防医学の面からも重要であることが示唆されている。

【0004】

従来、PAF-AH活性の測定には、バイオアッセイによる方法と放射性同位元素を用いる方法とが用いられてきた。

【0005】

バイオアッセイ法は、PAF-AHと基質のPAFとを一定時間反応させ、残存するPAFによる血小板凝集能をモニターすることにより、PAF-AHを測定する方法であるが、血小板を使用時に調製しなければならない、高価な試薬を用いなければならない等の欠点があり、一般の検査法として利用するには困難な問題点が存在した。

【0006】

他方、放射性同位元素を用いる方法 (RIA法) は、 ^3H 又は ^{14}C でPAFのアセチル基を標識してPAF-AHと反応させ、遊離された放射能活性を測定するか、又はアルキル基を標識してPAF-AHと反応させ、反応生成物であるリゾPAF又は未反応のPAFを回収して放射能活性を測定する方法である。しかし、この放射性同位元素を用いる方法では、放射性物質の使用及び使用設備が限定される上、安全性の問題、放射性試薬の廃棄等の問題がある。さらに、標識されたリゾPAFあるいは未反応の標識されたPAFを回収して残存する放射能活性を測定する場合には、リゾPAFあるいはPAFを有機溶剤で抽出し、クロマトグラフィーで分離しなければならない等の煩雑な操作が必要とされる等、一般の検査法として利用するには困難な問題点が存在した。

【0007】

そこで、このような煩雑な操作を要することなく、PAF-AH活性を測定する方法が検討されている。その一つの方法は、合成基質を用いる方法であり、近年、種々のPAF-AHの基質並びにPAF-AHの測定法が開発されている。

【0008】

例えば、特開平7-59597号公報には、PAF-AHの作用によりジカルボン酸を遊離するPAF類似化合物を基質として、PAF-AH活性を測定する方法が記載されている。この方法は、この基質に試料中のPAF-AHを作用させてジカルボン酸を生成させ、ついで生成したジカルボン酸に特異的に反応する酵素を作用させ、さらに連続する酵素

10

20

30

40

50

反応系を組み合わせ、 NAD^+ 、 NADP^+ 、 NADH 、 NADPH 又は過酸化水素等の汎用されているマーカー物質を生成させ、これらのマーカー物質を公知の方法により測定することにより、ジカルボン酸の生成速度又は生成量を求め、これによりPAF-AH活性を測定する方法である。この方法は、検出系に多数の酵素を組み合わせた酵素的測定法であるため、使用する酵素の安定性や特異性等の問題があり、試薬の性能を維持するのに注意を払う必要がある等の問題点がある。

【0009】

また、特開平4-346797号公報には、チオPAFおよびチオPAF類似体化合物を基質とするPAF-AH活性測定法が記載されている。この方法は、SH基と反応して定量的に呈色する呈色試薬を利用する方法である。この公報には、PAF-AHによりチオPAF等の基質から生成するリゾチオPAFの-SH基と5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)との置換反応によって遊離する2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸の黄色を追跡する方法が一例として記載されているが、この方法は、反応液や検体中に共存する他のチオール化合物や酸化還元性物質、例えばアスコルビン酸、ビリルビン、システイン又はグルタチオン等の干渉を受けやすく、酵素的測定法と同様に試薬の性能維持の面で問題がある。

【0010】

また、PAF類似化合物である1-ドデカノイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロールホスホコリンを基質とするPAF-AH活性測定法が知られている(Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 16巻, No 4 591-599 (1996))。しかしながら、この測定法では、血漿あるいは血清等の検体中に存在する種々のエステラーゼあるいはエステラーゼ様物質によっても基質が加水分解されることから、測定値は大きな正の影響を受け、正確なPAF-AH活性の測定は困難であった。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、種々のエステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けることのないPAF-AH活性の測定方法であって、放射性基質を用いることなく、安全でかつ操作が簡便な直接測定方法が望まれていた。すなわち、PAF-AHに特異性の高い基質、あるいは、種々のエステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けることが少ない測定系の開発が望まれていた。

【0012】

【課題を解決するための手段】

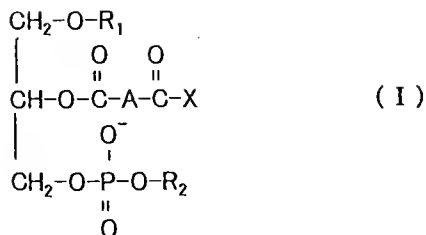
本発明者らは、上記課題を解決すべく、鋭意研究を行った結果、PAF-AHに比較的特異性が高い基質及び種々のエステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けることのないPAF-AH測定系を見出し、放射性基質を用いない、安全でかつ操作が簡便な、直接PAF-AH活性を測定できる方法を開発し、本発明を完成するに至った。

【0013】

本発明は、PAF-AH活性の測定方法であって、一般式(1)：

【0014】

【化6】



10

【0015】

(式中、 R_1 はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、A は酸素原子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数2～7の炭化水素基を表し、X は遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 R_2 はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) で表される基質と、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ含有試料とを、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤の存在下、反応させ、それによって遊離する発色性化合物又は蛍光発色性化合物の量を測定することを含む方法に関する。

20

【0016】

好適な実施態様においては、前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である。

【0017】

好適な実施態様においては、本発明の測定方法に用いられる阻害剤が、アニオン性界面活性剤、非イオン界面活性剤、胆汁酸塩、胆汁酸塩誘導体及びキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種の阻害剤である。

30

【0018】

また、好適な実施態様においては、本発明の測定方法に用いられるアニオン性界面活性剤が、アルキル硫酸のアルカリ金属塩又はアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩である。

【0019】

また、好適な実施態様においては、本発明の測定方法に用いられる非イオン界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル又はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである。

【0020】

また、好適な実施態様においては、本発明の測定方法に用いられる胆汁酸塩及び胆汁酸塩誘導体が、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、デヒドロコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロリトコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム、タウロデヒドロコール酸ナトリウム、CHAPS、CHAPSO、BIGCHAP、又はデオキシ-BIGCHAPである。

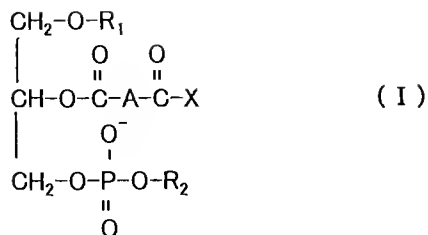
40

【0021】

また、本発明は、PAF-AH活性測定用試薬に関し、一般式(I)：

【0022】

【化7】



10

【0023】

(式中、 R_1 はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Aは酸素原子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数2～7の炭化水素基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 R_2 はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。)で表される基質と、PAF-AHを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤とを含有する、試薬に関する。

20

【0024】

好適な実施態様においては、PAF-AHとの反応に伴って、基質から芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物が遊離される。

【0025】

好適な実施態様においては、本発明の試薬に含まれる阻害剤が、アニオン性界面活性剤、非イオン界面活性剤、胆汁酸塩、胆汁酸塩誘導体及びキレート剤からなる群から選択される少なくとも1種の阻害剤である。

30

【0026】

また、好適な実施態様においては、本発明の試薬に含まれるアニオン性界面活性剤が、アルキル硫酸のアルカリ金属塩又はアルキルスルホン酸のアルカリ金属塩である。

【0027】

また、好適な実施態様においては、本発明の試薬に含まれる非イオン界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル又はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルである。

【0028】

また、好適な実施態様においては、本発明の試薬に含まれる胆汁酸塩及び胆汁酸塩誘導体が、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、デヒドロコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロリトコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム、タウロデヒドロコール酸ナトリウム、CHAPS、CHAPSO、BIGCHAP、又はデオキシ-BIGCHAPである。

40

【0029】

本発明は、さらに、前記試薬を含む、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定用キットに関する。

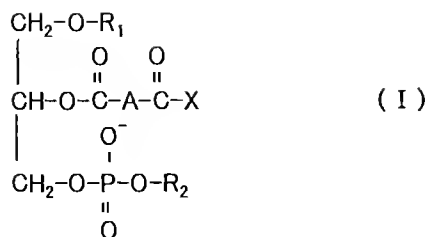
【0030】

また、本発明は、PAF-AH活性測定用キットであって、上記一般式(I)：

【0031】

【化8】

50



10

【0032】

(式中、 R_1 はアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、A は酸素原子が介在してもよい飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数2～7の炭化水素基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 R_2 はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) で表される基質を含む容器と、

20

PAF-AHを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤を含有する溶液を含む容器とを有する、キットに関する。

【0033】

好適な実施態様においては、PAF-AHとの反応に伴って、基質から芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物が遊離される。

【0034】

好適な実施態様においては、前記基質が、溶液あるいは溶媒中に溶解されている。

【0035】

別の好適な実施態様においては、本発明のキットは、さらに、前記基質を溶解する溶液あるいは溶媒を含有する容器を有する。

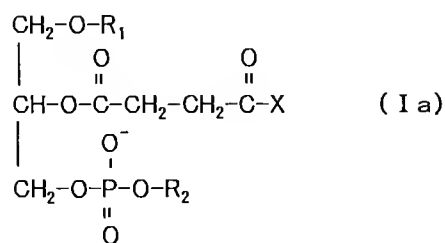
30

【0036】

さらに、本発明は、一般式(Ia)で表される化合物：

【0037】

【化9】



40

【0038】

(式中、 R_1 は炭素数6から20のアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Xは

50

遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 R_2 はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) に関する。

【0039】

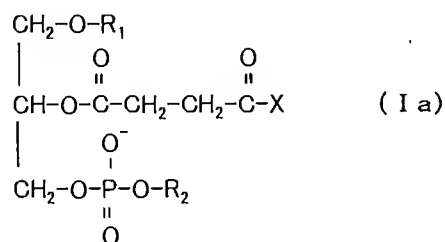
好適な実施態様においては、前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である。

【0040】

また、本発明は、PAF-AH活性の測定方法に関し、一般式(Ia)で表される化合物：

【0041】

【化10】



【0042】

(式中、 R_1 は炭素数6から20のアシル基、アルキル基又はアルケニル基を表し、Xは遊離したときに発色性化合物又は蛍光発色性化合物となる基を表し、 R_2 はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を表す。) で表される基質と、PAF-AH含有試料とを反応させ、それによって遊離する発色性化合物又は蛍光発色性化合物の量を測定することを含む測定方法に関する。

【0043】

好適な実施態様においては、前記発色性化合物が芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物である。

【0044】

上記の発明により、PAF-AHに比較的特異性が高い基質、及び種々のエステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けることのないPAF-AHの直接測定系が提供される。さらに、本発明は放射性基質を用いないので、日常の検査に安全、迅速、簡単な測定方法として充分利用できる方法を提供する。このように本発明のPAF-AHの測定方法は、(1)従来方法より測定時間が短縮される、(2)種々のエステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けない、(3)発色性化合物または蛍光発色性化合物をモニターすることにより直接PAF-AH活性を測定できる等の利点を有することから、従来法である発色系へ誘導する酵素や試薬を使用する方法よりも正確な測定が可能である。従って、本発明は、疾患の検定、予後の経過を短時間で診断できるため極めて有用性が高い発明である。

【0045】

さらに、本発明により、PAF-AH測定用の試薬並びにこれを含むキットが提供される。これらの試薬、キットにより、直接かつ簡便にPAF-AH活性が測定できるので、PAF-AH活性の変化に基づく疾患の診断、病状の進行が把握できる。従って、本発明の医療における貢献は大きい。

【0046】

【発明の実施の形態】

(本発明の測定方法の特徴)

本発明の、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ (P A F-A H) 活性の測定方法の特徴は、上記一般式 (I) で表される基質と共に、P A F-A H 以外のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤を添加することにより、これらのエステル分解活性関連物質による非特異的加水分解による発色性化合物あるいは蛍光発色性の化合物の放出を防止して、より精度よく、P A F-A H 活性を測定する点にある。すなわち、基質から遊離される発色性あるいは蛍光発色性の化合物が、できるだけ P A F-A H にのみ由来する様に測定系を設計することにある。また、一般式 (I) の基質のうち、一般式 (I a) で表される基質を用いれば、さらに感度よく測定することができる。

10

【0047】

本発明に用いる基質は、P A F-A H と反応すると、発色性あるいは蛍光発色性の化合物と結合したジカルボン酸誘導体を遊離するが、このジカルボン酸誘導体は遊離されると、発色性あるいは蛍光発色性の化合物を遊離 (放出) するという特徴を有している。すなわち、本発明に用いる基質と P A F-A H とが反応したとき、P A F-A H 活性と比例する量の発色性あるいは蛍光発色性置換芳香族化合物を遊離するため、その遊離された発色性あるいは蛍光発色性の化合物をモニターすることで、直接的に P A F-A H 活性を測定することができる。

【0048】

従来の測定法は、基質と P A F-A H を接触させて生成するジカルボン酸を酵素的に発色系に導くか、あるいは、5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) との置換を通して、遊離する2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸の発色系に導いており、直接的な発色ではないため、基質自体の分解だけでなく酵素の失活や他の発色系へ導く組成物の劣化等、測定の不正確性に関与する要素が多く、正確に P A F-A H 活性値を得られないことがあった。

20

【0049】

本発明の測定法によって、これら問題点が解決されるという格別な効果が奏される。すなわち、本発明による測定方法においては、P A F-A H によって直接的に検出可能な発色性あるいは蛍光発色性の化合物を生成するので、血清試料、血漿試料等に含まれるエステル分解活性関連物質による測定誤差をできるだけ小さくして、精度良く P A F-A H 活性を測定することができる。

30

【0050】

本願明細書において「エステル分解活性関連物質」には、エステル分解酵素 (エステラーゼ)、エステル分解酵素 (エステラーゼ) 様物質などの、エステル結合を切断する酵素あるいは物質が含まれる。エステル分解酵素 (エステラーゼ) 様物質としては、例えば、LDL に含まれるアポリポタンパク B 等のエステラーゼ活性を有するタンパク質が挙げられる。

【0051】

以下、本発明に用いる基質、その製造方法、本発明に用いる阻害剤、P A F-A H の測定用試薬、その試薬を用いる測定方法、及び P A F-A H の測定用キットについて、順次説明する。

40

【0052】

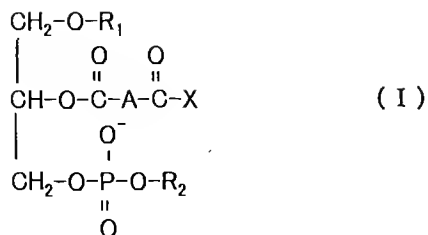
(本発明に用いる基質)

本発明の P A F-A H 測定方法に用いる基質は、一般式 (I) で表される。

一般式 (I) :

【0053】

【化11】



10

【0054】

において、 R_1 はアシル基、アルキル基又はアルケニル基が好ましい。炭素数は約6から約20位が好ましい。より好ましくは、約8から約18である。

【0055】

Aとしては、飽和または不飽和の、置換又は非置換の炭素数2～7の炭化水素基が好ましい。なかでも、炭素数2の化合物が好ましい。また、この炭化水素基は、酸素原子が介在してもよい。すなわち、 $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ 等の構造を有してもよい。

20

【0056】

Xは、 PAF-AH と基質とが反応して、ジカルボン酸誘導体が遊離すると遊離（放出）される化合物であり、発色性あるいは蛍光発色性であることが好ましい。Xは、好ましくは、加水分解されたときに、芳香族ヒドロキシ化合物又は芳香族チオール化合物となる基であり、例えば、4-ニトロフェニル基、2-クロロ-4-ニトロフェニル基、2-フルオロ-4-ニトロフェニル基、3-フルオロ-4-ニトロフェニル基、4-ニトロチオフェニル基、5-インドリルオキシ基、2,6-ジフェニル-4-ニトロフェニル基が挙げられる。

30

【0057】

蛍光発色性化合物としては、4-メチルクマリル基、クマリル基、フラボンオキシル基等が挙げられる。

【0058】

R_2 としては、モノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基が挙げられる。トリメチルアミノ基が好ましい。

【0059】

基質の中でも、Aの炭素数が2である基質は、一般式(Ia)で表わされる。

【0060】

【化12】

40



一般式 (I a) 中、 R_1 、X、及び R_2 は、それぞれ、前記 R_1 、X、及び R_2 と同じである。一般式 (I a) である化合物としては、例えば、1-ミリスチル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-s n-グリセロホスホコリンが好ましい。この化合物は、A の炭素数が 3 である場合の、1-ミリスチル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-s n-グリセロホスホコリンに比べて、4 倍以上も感度が上昇するという効果を有している。

本発明に用いられる基質として、上記の基質の他に、以下の基質が例示されるが、基質はこれらに限定されない。

1-デカノイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリン、

1-ラウロイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロホスホコリン、

1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリン、

1-オレオイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリン。

1-アルキル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリン

1-アルケニル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロホスホコリン

1-ミリスチル-2-(4-ニトロフェニルアジポイル)-sn-グリセロ-ホスホコリン、

1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルピメロイル)-sn-グリセロ-ホスホコリン、

1-ミリスチル-2-(4-ニトロフェニルスベロイル)-sn-グリセロ-ホスホコリン、

1-ミリスチル-2-(4-ニトロフェニルアゼロイル)-sn-グリセロホスホコリン、

1-ミリストイル-2-(2-クロロ-4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセ
ローホスホコリン、

1-ミリスチル-2-(4-メチルクマリルグルタリル)-sn-グリセロホスホコリン、

1-ミリスチル-2-(2-フルオロ-4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリ 50

セローホスホコリン、
 1-ミリストイル-2-(3-フルオロ-4-ニトロフェニルグルタリル)-s n-グリ
 セローホスホコリン、
 1-ミリストイル-2-(4-ニトロチオフェニルグルタリル)-s n-グリセローホス
 ホコリン、
 1-ミリストイル-2-(5-インドリルオキシグルタリル)-s n-グリセローホスホ
 コリン、
 1-ミリストイル-2-(2,6-ジフェニル-4-ニトロフェニルグルタリル)-s n-
 グリセローホスホコリン、
 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルグライコリル)-s n-グリセローホスホ
 コリン、
 1-ミリストイル-2-[5-ジメチルアミノ-2-(2-チアゾリルアゾ)フェニルサ
 クシニル]-s n-グリセローホスホコリン、
 1-ミリストイル-2-[1-(2-トリアゾリルアゾ)-2-ナフチルサクシニル]-
 s n-グリセローホスホコリン、
 1-ミリストイル-2-[(4-ニトロフェニル)ジメチルサクシニル]-s n-グリセ
 ローホスホコリン、
 1-ミリストイル-2-[(6-フラボンオキシル)サクシニル]-s n-グリセローホ
 スホコリン、及び
 1-パルミトイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-s n-グリセローホスホ
 コリン。

【0063】

(本発明に用いる基質の製造方法)

本発明に用いるPAF-AHの基質は、それ自体公知の方法に準じて製造できる。後述の
 合成例で詳細が説明される。例えば、特開昭52-89622号公報に記載の方法は、ホ
 スホリパーゼA2を用いて得られる1-アシルグリセロホスホコリン、1-0-アルキルホ
 スホコリン(市販のリゾPAF)、1-0-アルケニルホスホコリン(市販のリゾホスホ
 コリンプラズマローゲン)等を出発原料として用い、これらの出発原料と無水ジカルボン
 酸(例えば無水コハク酸)とを、無水クロロホルムと無水ジクロロメタン混液中、トリエ
 チルアミンを触媒として反応させて、2位に所望のジカルボン酸を導入して、1-アシル
 -2-モノジカルボニル-ホスホコリンを得る。無水コハク酸を用いた場合、1-アシル
 -2-サクシニル-ホスホコリンが得られる。

【0064】

このようにして得られた1-アシル-2-モノジカルボニル-ホスホコリンを、William
 N. Washburnら、J. Am. Chem. Soc. 112巻、2040-2041頁(1990)の記載に従って、塩化
 オキザリルによってクロライド化し、発色団である芳香族ヒドロキシ化合物、例えばp-
 ニトロフェノールをトリエチルアミン存在下でエステル化し、1-アシル-2-(4-ニ
 トロフェニルサクシニル)-ホスホコリンを得る。

【0065】

また、2位にメチレン基の長いジカルボン酸を導入する場合は、無水ジカルボン酸と保護
 基ベンジルアルコールとの反応により得られるモノベンジルカルボン酸エステル(第4版
 実験化学講座22 有機合成 I V 131頁)を用いることができる。前記の特開昭5
 2-89622号公報に記載された方法により、モノベンジルカルボン酸エステルと1-
 アシルグリセロホスホコリンとを反応させて、1-アシル-2-モノベンジルカルボニル
 ホスホコリンを得る。次いで、得られたモノベンジル体を、パラジウム/炭素を用いて、
 水素ガス雰囲気下で脱ベンジル化し、1-アシル-2-モノカルボニルホスホコリンを得
 る。このようにして得られた1-アシル-2-モノカルボニルホスホコリンを塩化オキザ
 リルによりクロライド化し、発色団である芳香族ヒドロキシ化合物、例えばp-ニトロフ
 ェノールをトリエチルアミン存在下でエステル化し、1-アシル-2-(4-ニトロフェ
 ニルアゼロイル)-ホスホコリンを得る。

【0066】

(本発明に用いる阻害剤)

本発明の測定方法としては、P A F-A Hを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤の存在下で行なう方法が好ましい。ここで、「P A F-A Hを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤」とは、P A F-A Hを阻害しないが他のエステル分解活性関連物質を阻害するという意味と、ある濃度ではP A F-A Hを阻害はしないが、他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤であるという意味の、両方の意味を含む。

【0067】

P A F-A H活性の測定において、血清あるいは血漿試料中に存在する他のエステル分解活性関連物質により、非特異的に基質のエステル結合が加水分解され、一般式(I)または(I a)におけるX(例えば、発色性化合物)が遊離され、P A F-A H活性のノイズとなるので好ましくない。そこで、血清あるいは血漿試料のP A F-A Hを測定する場合は、P A F-A Hを阻害しないが、他のエステル分解活性関連物質(活性)を阻害する阻害剤(以下、非特異反応抑制剤ということもある)を存在させることが好ましい。

【0068】

このような阻害剤としては、アニオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、胆汁酸塩、胆汁酸塩誘導体等が用いられるが、これらに限定されない。阻害剤は、1種のみ用いてもよく、2種以上組み合わせ用いてもよい。好適な組み合わせはアニオン性界面活性剤と非イオン性界面活性剤、あるいは、アニオン性界面活性剤と胆汁酸塩又は胆汁酸塩誘導体との組み合わせである。同種の阻害剤を2以上用いてもよい。

【0069】

アニオン性界面活性剤としては、脂肪酸塩(例えば、ステアリン酸ナトリウム、オレイン酸カリウム等)、アルキル硫酸エステル塩(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸リチウム等)、アルキルベンゼンスルホン酸塩(例えば、ラウリルベンゼンスルホン酸ナトリウム、4-n-オクチルベンゼンスルホン酸ナトリウム等)、アルキルナフタレンスルホン酸塩(例えば、2-ナフタレンスルホン酸ナトリウム等)、アルキルスルホコハク酸塩(例えば、ジアルキルスルホコハク酸ナトリウム等)、アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸塩(例えば、アルキルジフェニルエーテルジスルホン酸ナトリウム等)、アルキルリン酸塩(例えば、アルキルリン酸カリウム等)、ポリオキシエチレンアルキル硫酸エステル塩(例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンラウリルエーテル硫酸トリエタノールアミン等)、ポリオキシエチレンアルキルアリル硫酸エステル塩(例えば、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル硫酸ナトリウム等)、アルキルスルホン酸塩(例えば、オクタンスルホン酸ナトリウム、ノナンスルホン酸ナトリウム、デカンスルホン酸ナトリウム、トリデカンスルホン酸ナトリウム等)、ナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物(例えば、 β -ナフタレンスルホン酸ホルマリン縮合物のナトリウム塩等)、ポリオキシエチレンアルキルリン酸エステルからなる群から選択される、少なくとも1つのアニオン性界面活性剤であることが好ましい。

【0070】

非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル(例えば、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル等)、ポリオキシエチレンアルキルアリルエーテル(例えば、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル等)、ポリオキシエチレン誘導体(ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン縮合物等)、ソルビタン脂肪酸エステル(例えば、ソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノパルミテート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタンモノオレエート、ソルビタントリラウレート、ソルビタントリステアレート、ソルビタントリオレエート、ソルビタンジステアレート等)、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル(例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート

ト、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート等)、ポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステル(例えば、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット等)、グリセリン脂肪酸エステル(例えば、グリセロールモノステアレート、グリセロールモノオレエート等)、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル(例えば、ポリエチレングリコールモノラウレート、ポリエチレングリコールモノステアレート、ポリオキシエチレングリコールモノオレエート、ポリエチレングリコールジステアレート等)、ポリオキシエチレンアルキルアミン、アルキルアルカノールアミドからなる群から選択される、少なくとも1つの非イオン性界面活性剤が好ましい。

10

【0071】

胆汁酸塩並びに胆汁酸塩誘導体としてはコール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、ケノデオキシコール酸ナトリウム、デヒドロコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、タウロリトコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム、タウロケノデオキシコール酸ナトリウム、タウロウルソデオキシコール酸ナトリウム、タウロデヒドロコール酸ナトリウム、CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] propanesulfonic acid、CHAPSO: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] -2-hydroxypropanesulfonic acid、BIGCHAP: N,N-Bis(3-D-gluconamidopropyl)cholamide、deoxy-BIGCHAP: N,N-Bis(3-D-gluconamidopropyl)deoxycholamideから選択される、少なくとも1つの胆汁酸塩並びに胆汁酸塩誘導体が好ましい。

20

【0072】

(PAF-AH活性測定用試薬)

本発明のPAF-AH活性測定用試薬は、上記一般式(1)又は(1a)で表されるPAF-AHの基質を含む。基質は、0.001mM~250mM、より好ましくは0.01mM~100mM、さらに好ましくは0.01mM~10mMの濃度範囲で使用する。

【0073】

なお、PAF-AH活性測定用試薬は、好適には、溶液であり、PAF-AHの基質は、各基質の安定なpHを選択して、好ましくは、pH約3~約9の緩衝液(例えば、HEPES緩衝液、クエン酸緩衝液、酒石酸緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、トリス緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等)に溶解される。

30

【0074】

また、本発明のPAF-AH活性測定用試薬は、好ましくは、上記非特異反応阻害剤を含む。非特異反応阻害剤の濃度は、阻害剤がPAF-AHを阻害しない場合は、特に制限はないが、PAF-AHを阻害する場合は、PAF-AHを阻害しない濃度を予め決定して、それ以下の濃度で用いればよい。

【0075】

本発明のPAF-AH活性測定用試薬は、これらの成分以外に、PAF-AHの基質を溶解するために、必要に応じて、水混和性有機溶媒を含んでもよい。水混和性有機溶媒としては、アルコール(例えば、メタノール、エタノール、n-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール)、ケトン(例えば、アセトン、メチルイソブチルケトン)、エステル(例えば、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、プロピオン酸メチル)などが挙げられる。水混和性有機溶媒は、PAF-AHの活性に影響を与えないように、好ましくは最終の溶液重量に基づいて、約30重量%以下、より好ましくは約20重量%以下含まれる。

40

【0076】

本発明のPAF-AH活性測定用試薬は、発色性あるいは蛍光発色性の化合物の解離を促進する物質を含んでもよい。これらの物質としては、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、あるいはこれらのシクロデキストリンに塩基性官能基(例えば、ジエチルアミノエチル、ジメチルアミノエチル、あるいはトリメチルアンモニオエチル等の4級アンモニウム塩)を導入したシクロデキストリン類が挙げられる。これらの化合物は、約0.5%含まれてもよい。

50

【0077】

また、本発明のP A F-A H活性測定用試薬には、キレート試薬を共存させることが好ましい。キレート試薬を共存させることにより、アリルエステラーゼや Ca^{2+} 依存性のホスホリパーゼ A_2 による、本発明に用いる基質の分解反応を抑制することができ、P A F-A H活性を特異的に測定することができるようになる。このキレート試薬としては、E D T AあるいはE G T A等の適切なキレート剤が使用できる。キレート剤は、約20mM含まれてもよい。

【0078】

さらに、本発明のP A F-A H活性測定用試薬には、上記の他に、緩衝剤、安定化剤、活性化剤、賦形剤等の酵素の活性測定に一般に用いられているものを含んでいてもよい。

【0079】

また、後に詳細に説明するが、本発明においては、H D L associated-P A F-A H活性、L D L associated-P A F-A H活性、及び総血清型P A F-A H活性をそれぞれ測定することができる。H D L associated-P A F-A H活性を測定するために、本発明のP A F-A H活性測定用試薬には、L D Lを凝集させる物質として、アニオン性化合物（例えば、デキストラン硫酸、硫酸化シクロデキストリン、硫酸化オリゴ糖、ヘパリン、ペパラン硫酸、リンタングステン酸等）等のイオン性化合物、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、等のカチオン、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体（例えば、抗アポリポタンパクB抗体等）等を適量含めることができる。

【0080】

また、L D L associated-P A F-A Hを分別定量するために、本発明のP A F-A H活性測定用試薬には、H D Lを凝集させる物質として、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体（抗アポリポタンパクA抗体、抗アポリポタンパクE抗体等）を適量含めることができる。

【0081】

（P A F-A H活性の測定）

本発明の測定方法は、上記で作成したP A F-A H活性測定用試薬にP A F-A H活性を有する（と思われる）試料を添加して反応させ、遊離する発色性あるいは蛍光性化合物の吸光度、励起された蛍光を測定して定性的にあるいは定量的に測定する方法である。

【0082】

P A F-A H活性を測定する試料としては、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿もしくは羊水等の体液、そして、ヒト又は動物の細胞、臓器若しくは細胞及び臓器の抽出液等が用いられる。P A F-A H精製品及び血清、血漿等P A F-A Hを含む被検試料は、pH 6～9の緩衝液（例えば、H E P E S緩衝液、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等）で適宜希釈して、20～40℃に保持して、測定反応に使用する。これらの緩衝液には、適切な塩濃度となるように、N a C l、K C l等を添加してもよい。

【0083】

本発明のP A F-A Hの活性測定法においては、基質の加水分解により遊離される発色性あるいは蛍光発色性の量を測定する。定量は、吸光度の測定により行なう。測定はエンド法でもレート法でも行うことができる。エンド法の場合は、まず、基質を除いた測定試薬と試料とを反応させて、検体ブランクを測定する必要がある。レート法の場合には、定量的に測定が行える時間内に吸光度の測定を行えば良い。なお、P A F-A Hの活性値の算出は、遊離される発色性あるいは蛍光発色性物質の分子吸光係数より行うことができる。

【0084】

また、本発明のP A F-A Hの活性測定方法は、用手法でも自動分析装置を用いても行うことができる。基質から遊離される発色性または蛍光発色性の化合物の吸光度変化を測定する。例えば、発色性化合物の場合、波長280～560nmにおける吸光度変化を、また、蛍光発色性化合物の場合、レーザー光を照射して蛍光を励起させることにより分光学的に検出し、単位時間当たりの吸光度変化量を求める（いわゆるレートアッセイ法）こと

で、精度良く PAF-AH 活性を求めることができる。

【0085】

例えば、本発明の一般式 (I) の A の炭素数が 2 である基質（すなわち、一般式 (Ia)）の 1-ミリスチル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロホスホコリンを用いると、4-ニトロフェノールが生成する。このとき 4-ニトロフェノールの増加に伴って、4-ニトロフェノールの吸収波長である 405 nm における吸光度も定量的に増加するので、405 nm における吸光度の増加速度又は増加量が算出される。

【0086】

さらに、本発明の PAF-AH 活性測定法を用いて、HDL associated-PAF-AH 活性、LDL associated-PAF-AH 活性、及び総血清型 PAF-AH 活性を分別して、それぞれ、正確に測定できる。LDL を凝集させる物質を含有する測定試薬を用いることにより、LDL を凝集、除去し、HDL associated-PAF-AH を定量することができる。また、HDL を凝集させる物質を含有する測定試薬を用いることにより、HDL を凝集、除去し、LDL associated-PAF-AH を定量することができる。どちらも添加しなければ、総血清型 PAF-AH 活性が測定される。

【0087】

具体的な測定方法を以下に述べる。まず、適切な緩衝液に溶解した阻害剤を含む阻害剤試薬（例えば、阻害剤と 150 mM NaCl を含む 50 mM HEPES 緩衝液 (pH7.4)）、基質溶液（例えば、16% エタノール、基質及び 150 mM NaCl を含む 50 mM HEPES 緩衝液 (pH7.4)）とを準備する。ヒトプール血清あるいは PAF-AH 精製品溶液の適量を阻害剤溶液と混合した後、これに基質溶液を加えて反応させる。反応の pH は、好ましくは、約 6.5 ~ 約 8.0、最も好ましくは、約 7.4 である。反応温度は、20℃ ~ 40℃、好ましくは 37℃ である。基質溶液添加後、適当な時間（例えば、2 分目から 5 分目にかけて）、吸光度を測定し、単位時間当たりの吸光度の変化量を求め、発色性化合物あるいは蛍光発色性化合物の分子吸光係数から、PAF-AH 活性値 (nmol/min/試料 1 ml) を求めることができる。

【0088】

また、レート法により自動測定する場合には、まず、上記阻害剤溶液、基質溶液を準備する。例えば、H-7170 型自動分析装置（日立製作所）を用いて、測定のパラメーターに従って、測定する。ヒトプール血清あるいは PAF-AH 精製品と阻害剤溶液とを混合し、一定時間後、基質溶液を混合して反応を開始する。このときの吸光度変化（タイムコース）をモニターし、反応開始後 2 分目から 5 分目にかけての単位時間（1 分間）当たりの吸光度の変化量を求める。試料から得られる単位時間当りの吸光度の変化量 (ΔE_s) と、試料の代わりに精製水を加えて得られた単位時間当りの吸光度の変化量 (ΔE_B)、及び反応溶液における発色性化合物あるいは蛍光発色化合物の分子吸光係数 (ϵ) から、下記式により、各血清試料の PAF-AH 活性値を算出する。

【0089】

【数 1】

$$\text{PAF-AH (nmol/min/ml)} = \frac{(\Delta E_s - \Delta E_B) \times \text{最終反応液量} \times 10^6}{\epsilon \times \text{試料量} \times \text{層長}}$$

【0090】

(PAF-AH 活性測定キット)

本発明の PAF-AH 活性測定用キットは、基質、必要に応じて、非特異反応抑制剤及びその他の添加剤が添加された上記 PAF-AH 活性測定用試薬を含む。キットは、例えば

、P A F-A H 活性測定用試薬を含むアンプルの形態、P A F-A H 活性測定用試薬がウエルに一定量注入された形態、あるいはP A F-A H 活性測定用試薬を含む容器と測定用のウエルとを含む形態であり得る。これらの形態のキットに付属のP A F-A H 活性測定用試薬に血清試料を添加することにより、P A F-A H 活性が測定される。

【0091】

また、本発明のP A F-A H 活性測定用キットは、基質、必要に応じて、非特異反応抑制剤及びその他の添加剤が添加された上記P A F-A H 活性測定用試薬を含有する試験片であり得る。試薬が溶液の場合、試薬に浸漬後、乾燥した試験片であってもよい。これを血清等に浸すことにより、定性的にP A F-A H 活性が確認できる。また、比色表を用いておよその活性を知ることにもできる。従って、容器には、このような試験片も含まれる。

10

【0092】

さらに、本発明のキットは、上記一般式(I)で表される基質と、P A F-A H を阻害しないが他のエステル分解活性関連物質を阻害する阻害剤(非特異反応抑制剤)を含有する溶液とがそれぞれ、独立した容器に充填されており、使用に際して混合されるようにされていてもよい。この場合、基質は溶液あるいは溶媒に溶解されていてもよく、基質を溶解するための溶液及び/又は溶媒が別途独立した容器に含まれてもよい。どのような形態を選択するかは、基質の安定性、操作性、使用量等を考慮して決定すればよい。

【0093】

さらに、上記の基質等の他に、吸光度測定のための用具、装置等もキットに含まれ得る。

20

【0094】

【実施例】

以下、実施例に基づいて、本発明をより具体的に説明するが、本発明は、この実施例によって何等限定されるものではない。

【0095】

(実施例1：基質の製造)

化合物番号1～25の製造例を以下に示す。

【0096】

(化合物番号1：1-オクタノイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-オクタノイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 340mg(0.68mmol)をジクロロメタン(脱水)3mlに溶解し、氷冷下2M塩化オキザリル800μl(1.6mmol)を加えた後、室温下1.5時間攪拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン(脱水)3mlに溶解し室温攪拌下、4-ニトロフェノール 104mg(0.75mmol)、トリエチルアミン 138μl(1.36mmol)、ジクロロメタン(脱水)3mlの溶液を加えた。室温下2.5時間攪拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノール(2：1)60mlを加え、水洗(15ml)した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、ジエチルエーテルを加え、白濁させ一夜放置した。上澄みを取り、残渣をクロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色油状物 218mg(52%)を得た。

30

【0097】

(化合物番号2：1-デカノイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-デカノイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 272mg(0.55mmol)をジクロロメタン(脱水)3mlに溶解し、氷冷下2M塩化オキザリル550μl(1.1mmol)を加えた後、室温下1.5時間攪拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン(脱水)3mlに溶解し室温攪拌下、4-ニトロフェノール 84mg(0.6mmol)、トリエチルアミン 101μl(1.1mmol)、ジクロロメタン(脱水)3mlの溶液を加えた。室温下2.5時間攪拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノール(2：1)60mlを加え、水洗(15ml)した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮しメタノールでシリカゲルカラム精製をし、さらにクロロホルム-メタノール-水系でシ

40

50

リカゲルカラム精製を行い、黄色アモルファス晶 114 mg (32%) を得た。

【0098】

(化合物番号3: 1-ラウロイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-ラウロイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 290 mg (0.52 mmol) をジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 520 μ l (1.04 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間攪拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し室温攪拌下、4-ニトロフェノール 79 mg (0.57 mmol)、トリエチルアミン 115 μ l (1.04 mmol)、ジクロロメタン (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室温下 2.5 時間攪拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム:メタノール (2:1) 60 ml を加え、水洗 (15 ml) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮しクロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、目的画分 171 mg (49%) を得た。

10

【0099】

(化合物番号4: 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 283 mg (0.49 mmol) をクロロホルム (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 490 μ l (0.98 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間攪拌した。減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 3 ml に溶解し室温攪拌下、4-ニトロフェノール 102.1 mg (0.74 mmol)、トリエチルアミン 137 μ l (0.98 mmol)、クロロホルム (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室温下 2 時間攪拌した後、0.1 規定塩酸 1 ml を加えた。この溶液にクロロホルム:メタノール (2:1) 75 ml を加え、水洗 (15 ml) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色アモルファス 182 mg (53%) を得た。

20

【0100】

NMR (CDCl₃): 0.89(t, 3H, J=7.0 Hz), 1.25(s, 20H), 1.50-1.65(m, 2H), 1.95-2.12 (m, 2H), 2.29(t, 2H, J=7.7 Hz), 2.40-2.55(m, 2H), 2.71(t, 2H, J=7.3 Hz), 3.38(s, 9H), 3.80(br, 2H), 3.92-4.05(m, 2H), 4.10-4.20(m, 1H), 4.25-4.45(m, 3H), 5.15-5.30(m, 1H), 7.31(d, 2H), 8.29(d, 2H);

30

MS(SIMS): 703(MH⁺)

【0101】

(化合物番号5: 1-オレオイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-オレオイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 350 mg (0.55 mmol) をジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 550 μ l (1.1 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間攪拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し室温攪拌下、4-ニトロフェノール 84 mg (0.61 mmol)、トリエチルアミン 153 μ l (1.1 mmol)、ジクロロメタン (脱水) 3 ml の溶液を加えた。室温下 2.5 時間攪拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム:メタノール (2:1) 60 ml を加え、水洗 (15 ml) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、シリカゲルカラム精製 (メタノール) をし、目的画分 303 mg (73%) を得た。

40

【0102】

(化合物番号6: 1-アルキル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-アルキル-2-グルタリルホスファチジルコリン 267 mg (0.45 mmol) をジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 450 μ l (0.9 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間攪拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水) 3 ml に溶解し室温攪拌下、4-ニトロフェノール 69 mg (0.5 mmol)、トリエチルアミン

50

1.25 μ L (0.9 mmol)、ジクロロメタン (脱水) 3 mL の溶液を加えた。室温下 2.5 時間攪拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノール (2:1) 60 mL を加え、水洗 (15 mL) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮しメタノールでシリカゲルカラム精製をし、さらにクロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色アモルファス晶 146 mg (45%) を得た。

【0103】

(化合物番号 7: 1-アルケニル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル) -sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

化合物番号 6 の合成と同様に実施し、黄色アモルファス晶 98 mg (60%) を得た。

【0104】

(化合物番号 8: 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル) -sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-サクシニルホスファチジルコリン 200 mg (0.35 mmol) をジクロロメタン (脱水) 3 mL に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 350 μ L (0.71 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間攪拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水) 3 mL に溶解し室温攪拌下、4-ニトロフェノール 154 mg (0.39 mmol)、トリエチルアミン 98 μ L (0.71 mmol)、クロロホルム (脱水) 3 mL の溶液を加えた。室温下 1.5 時間攪拌した後この溶液にクロロホルム：メタノール (2:1) 60 mL を加え、水洗 (15 mL) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、淡黄色油状物 229 mg (64%) を得た。

【0105】

NMR (CDCl₃): 0.80-0.95(m, 3H), 1.26(br, 20H), 1.57(br, 2H), 2.22-2.29(m, 2H), 2.75-2.82(m, 2H), 2.82-2.93(m, 2H), 3.34(s, 9H), 3.79(br, 2H), 4.01(br, 2H), 4.10-4.22(m, 1H), 4.22-4.48(m, 4H), 5.27(br, 1H), 7.30-7.36(m, 2H), 8.27-8.32(m, 2H); MS(SIMS): 689(MH⁺)

【0106】

(化合物番号 9: 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルアジポイル) -sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

化合物番号 8 の合成と同様に実施し、黄色油状物 167 mg (52%) を得た。

【0107】

(化合物番号 10: 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルピメロイル) -sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

化合物番号 8 の合成と同様に実施し、黄色油状物 341 mg (82%) を得た。

【0108】

(化合物番号 11: 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルスベロイル) -sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

化合物番号 8 の合成と同様に実施し、黄色油状物 114 mg (34%) を得た。

【0109】

(化合物番号 12: 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルアゼロイル) -sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

化合物番号 8 の合成と同様に実施し、黄色油状物 190 mg (76%) を得た。

【0110】

NMR (CDCl₃): 0.89(m, 3H), 1.20-1.50(m, 26H), 1.60(br, 4H), 1.70-1.85(m, 2H), 2.30(m, 4H), 2.61(t, 2H, J=7.46 Hz), 3.38(s, 9H), 3.83(br, 2H), 3.90-4.02(m, 2H), 4.10-4.22(m, 1H), 4.25-4.50(m, 3H), 5.23(br, 1H), 7.21-7.35(m, 2H), 8.20-8.35(m, 2H)。

【0111】

(化合物番号 13: 1-ミリストイル-2-(2-クロロ-4-ニトロフェニルグルタリル) -sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 177 mg (0.3 mmol) をジ

10

20

30

40

50

クロロメタン（脱水）3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 300 μ l (0.6 mmol) を加えた後、室温下 2 時間撹拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン（脱水）3 ml に溶解し室温撹拌下、2-クロロ-4-ニトロフェノール 104 mg (0.6 mmol)、トリエチルアミン 84 μ l (0.6 mmol)、ジクロロメタン（脱水）3 ml の溶液を加えた。室温下 3 日間撹拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノール（2：1）60 ml を加え、水洗（15 ml）した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色油状物 156 mg（71%）を得た。

【0112】

（化合物番号 14：1-ミリストイル-2-[(4-メチル) クマリルグルタリル]-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成）

1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 191 mg (0.33 mmol) をジクロロメタン（脱水）3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 328 μ l (0.67 mmol) を加えた後、室温下 2 時間撹拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン（脱水）3 ml に溶解し室温撹拌下、4-(メチル) クマリン 115 mg (0.67 mmol)、トリエチルアミン 91.4 μ l (0.67 mmol)、ジクロロメタン（脱水）3 ml の溶液を加えた。室温下 4 日間撹拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノール（2：1）60 ml を加え、水洗（15 ml）した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、無色アモルファス 183.2 mg（76.5%）を得た。

【0113】

NMR (CDCl₃): 0.89(t, 3H, J=6.9 Hz), 1.25(br, 20H), 1.50-1.65(m, 2H), 1.95-2.12(m, 2H), 2.29(t, 2H, J=7.7 Hz), 2.44 (s, 3H), 2.47-2.51(m, 2H), 2.70(t, 2H, J=7.2 Hz), 3.38(s, 9H), 3.82(br, 2H), 3.98-4.03(m, 2H), 4.11-4.22(m, 1H), 4.30-4.48(m, 3H), 5.19-5.32 (m, 1H), 6.27(s, 1H), 7.00-7.11(m, 1H), 7.11-7.20(m, 1H), 7.58-7.70(m, 1H); MS(SIMS): 726(MH⁺)

【0114】

（化合物番号 15：1-ミリストイル-2-(2-フルオロ-4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成）

1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 266 mg (0.46 mmol) をクロロホルム（脱水）3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 457 μ l (0.91 mmol) を加えた後、室温下 1.5 時間撹拌した。減圧濃縮後クロロホルム（脱水）3 ml に溶解し室温撹拌下、2-フルオロ-4-ニトロフェノール 107.7 mg (0.69 mmol)、トリエチルアミン 127.4 μ l (0.91 mmol)、クロロホルム（脱水）3 ml の溶液を加えた。室温下 3 時間撹拌した後、0.1 規定塩酸 1 ml を加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール（2：1）70 ml を加え、水洗（15 ml）した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色アモルファス 260 mg（79%）を得た。

【0115】

（化合物番号 16：1-ミリストイル-2-(3-フルオロ-4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成）

化合物番号 15 の合成と同様に実施し、黄色アモルファス晶 171 mg（62%）を得た。

【0116】

（化合物番号 17：1-ミリストイル-2-(4-ニトロチオフェニル) グルタリルホスファチジルコリンの合成）

1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 227 mg (0.39 mmol) をクロロホルム（脱水）3 ml に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 390 μ l (0.78 mmol) を加えた後、室温下 2 時間撹拌した。減圧濃縮後クロロホルム（脱水）3 ml に溶解し室温撹拌下、4-ニトロチオフェノール 90.8 mg (0.59 mmol)、トリエチルアミン 90.8 mg (0.59 mmol) を加えた。室温下 3 時間撹拌した後、0.1 規定塩酸 1 ml を加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール（2：1）70 ml を加え、水洗（15 ml）した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色アモルファス 260 mg（79%）を得た。

ルアミン 108.3 μ L (0.78 mmol)、クロロホルム (脱水) 3 mL の溶液を加えた。室温下 2 時間攪拌した後、0.1 規定塩酸 1 mL を加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール (2:1) 70 mL を加え、水洗 (15 mL) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、褐色油状物 202 mg (72%) を得た。

【0117】

NMR (CDCl₃) : 0.80-0.98(m, 3H), 1.27(br, 20H), 1.59(br, 2H), 1.92-2.12(m, 2H), 2.20-2.35(m, 2H), 2.35-2.52(m, 2H), 2.70-2.88(m, 2H), 3.37(s, 9H), 3.82(br, 2H), 3.90-4.02(m, 2H), 4.02-4.20(m, 1H), 4.22-4.47(m, 3H), 5.22(br, 1H), 7.51-7.65(m, 2H), 8.15-8.31(m, 2H); MS(SIMS) : 719(MH⁺)。 10

【0118】

(化合物番号 18 : 1-ミリストイル-2-(5-インドリルオキシグルタリル) -sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 205 mg (0.35 mmol) をクロロホルム (脱水) 3 mL に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 352 μ L (0.7 mmol) を加えた後、室温下 2 時間攪拌した。減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 3 mL に溶解し室温攪拌下、5-ヒドロキシインドール 70.4 mg (0.53 mmol)、トリエチルアミン 98.2 μ L (0.7 mmol)、クロロホルム (脱水) 3 mL の溶液を加えた。室温下 2 時間攪拌した後、0.1 規定塩酸 1 mL を加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール (2:1) 70 mL を加え、水洗 (15 mL) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮しクロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色油状物 143 mg (59%) を得た。 20

【0119】

NMR (CDCl₃) : 0.80-1.00(m, 3H), 1.20-1.40(m, 20H), 1.50-1.65(m, 2H), 1.91-2.15(m, 2H), 2.18-2.35(m, 2H), 2.35-2.51(m, 2H), 2.51-2.70(m, 2H), 2.78(s, 9H), 3.00-3.29(m, 3H), 3.89-4.27(m, 5H), 4.27-4.50(m, 1H), 5.21(br, 1H), 6.41(s, 1H), 6.70-6.90(m, 1H), 7.21(s, 1H), 7.40-7.65(m, 1H), 11.18(s, 1H); MS(SIMS) : 697(MH⁺)。 30

【0120】

(化合物番号 19 : 1-ミリストイル-2-(2,6-ジフェニル-4-ニトロフェニルグルタリル) -sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 254 mg (0.44 mmol) をクロロホルム (脱水) 3 mL に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 437 μ L (0.87 mmol) を加えた後、室温下 2 時間攪拌した。減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 3 mL に溶解し、室温攪拌下、2,6-ジフェニル-4-ニトロフェノール 191 mg (0.65 mmol)、トリエチルアミン 122 μ L (0.87 mmol)、クロロホルム (脱水) 3 mL の溶液を加えた。室温下 16 時間攪拌した後、0.1 規定塩酸 1 mL を加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール (2:1) 70 mL を加え、水洗 (15 mL) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色油状物 219 mg (58%) を得た。 40

【0121】

NMR (CDCl₃) : 0.89(t, 3H, J=7.2 Hz), 1.26(br, 20H), 1.26-1.61(m, 4H), 1.91(t, 2H, J=7.6 Hz), 2.14(t, 2H, J=7.1 Hz), 2.26(t, 2H, J=7.8 Hz), 3.31(s, 9H), 3.74(br, 2H), 3.92(t, 2H, J=6.0 Hz), 4.00-4.15(m, 1H), 4.28(br, 2H), 4.30-4.42(m, 1H), 5.14(br, 1H), 7.32-7.50(m, 10H), 8.28(s, 2H); MS(SIMS) : 855(MH⁺)。 40

【0122】

(化合物番号 20 : 1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルグライコリル) -sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-グライコリルホスファチジルコリン 164 mg (0.28 mmol) をクロロホルム (脱水) 3 mL に溶解し、氷冷下 2 M 塩化オキザリル 281 μ L (0.56 mmol) を加えた後、室温下 2 時間攪拌した。減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 3 mL に溶解し室 50

温撹拌下、4-ニトロフェノール 43.0mg (0.31mmol)、トリエチルアミン 78 μ L (0.56mmol)、クロロホルム (脱水) 3mL の溶液を加えた。室温下2時間撹拌した後、0.1規定塩酸 1mLを加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール (2:1) 56mLを加え、水洗 (14mL) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、黄色油状物 102mg (51%)を得た。

【0123】

(化合物番号21: 1-ミリストイル-2-[5-ジメチルアミノ-2-(2-チアゾリルアゾ)フェニルサクシニル]-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-ミリストイル-2-サクシニルホスファチジルコリン 419mg (0.74mmol) をクロロホルム (脱水) 6mL に溶解し、氷冷下 2M 塩化オキザリル 738 μ L (1.48mmol) を加えた後、室温下 2.5時間撹拌した。減圧濃縮後クロロホルム (脱水) 6mL に溶解し室温撹拌下、5-ジメチルアミノ-2-(2-チアゾリルアゾ)フェノール 202mg (0.81mmol)、トリエチルアミン 206 μ L (1.48mmol)、クロロホルム (脱水) 6mL の溶液を加えた。室温下2時間撹拌した後、0.1規定塩酸 2mLを加えた。この溶液にクロロホルム：メタノール (2:1) 150mLを加え、水洗 (30mL) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮し、クロロホルム-メタノール-水系でシリカゲルカラム精製を行い、赤色油状物 247mg (42%)を得た。

【0124】

(化合物番号22: 1-ミリストイル-2-[1-(2-トリアゾリルアゾ)-2-ナフチルサクシニル]-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

化合物番号21の合成と同様に実施し、赤褐色油状物 64mg (14%)を得た。

【0125】

(化合物番号23: 1-ミリストイル-2-[(4-ニトロフェニル)ジメチルサクシニル]-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

化合物番号21の合成と同様に実施し、白色アモルファス晶 150mg (49%)を得た。

【0126】

(化合物番号24: 1-ミリストイル-2-[(6-フラボンオキシル)サクシニル]-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

化合物番号21の合成と同様に実施し、白色アモルファス晶 295mg (68%)を得た。

【0127】

NMR (CDCl₃): 0.87(t, 3H, J=6.9 Hz), 1.24(br, 20H), 1.46-1.64(m, 2H), 2.25(t, 2H, J=7.7 Hz), 2.65-3.09(m, 6H), 3.33(s, 9H), 3.78(br, 2H), 4.00(t, 2H, J=6.7Hz), 4.09-4.20(m, 1H), 4.23-4.43(m, 3H), 5.17-5.31(m, 1H), 5.41-5.56(m, 1H), 7.10-7.65(m, 8H)。

【0128】

(化合物番号25: 1-パルミトイル-2-(4-ニトロフェニルグルタニル)-sn-グリセロ-ホスホコリンの合成)

1-パルミトイル-2-グルタリルホスファチジルコリン 320mg (0.51mmol) をジクロロメタン (脱水) 3mL に溶解し、氷冷下 2M 塩化オキザリル 765 μ L (1.53mmol) を加えた後、室温下1.5時間撹拌した。減圧濃縮後ジクロロメタン (脱水) 3mL に溶解し室温撹拌下、4-ニトロフェノール 104mg (0.75mmol)、トリエチルアミン 139 μ L (1.02mmol)、ジクロロメタン (脱水) 3mL の溶液を加えた。室温下2.5時間撹拌した後、減圧濃縮した。これにクロロホルム：メタノール (2:1) 75mLを加え、水洗 (15mL) した。下層を取り、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ろ液を濃縮した。残渣をシリカゲルカラム精製 (メタノール) を行い、黄色アモルファス 203.6mg (55%)を得た。

【0129】

(実施例2: PAF-AH活性の測定; 基質特異性)

(酵素 PAF-AH の精製例)

ヒト血漿約 400mL を KBr で比重 d = 1.063 に調製し、遠心分離して、カイロミ

10

20

30

40

50

クロン、VLDL、及びLDLを含む画分を得た。10mM CHAPSを含む50mM トリス-塩酸 (Tris-HCl) 緩衝液 (pH 7.4) で透析後、予め 10mM CHAPSを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したQセファロースカラムに付した。同じ緩衝液でカラムを洗浄した後、NaCl (0-0.5M)の直線グラジエントにより溶出した。溶出されたPAF-AH活性部分をセントリップ30で濃縮し、10mM CHAPS, 0.3M NaClを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したセファクリルS-200に付した。同じ緩衝液で溶出させたPAF-AH活性部分をセントリップ30で濃縮すると共に緩衝液を10mM CHAPS, 0.3M NaClを含む25mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したブルーセファロースカラムに付した。同じ緩衝液で洗浄した後、10mM CHAPS, 1.5M NaClを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で溶出した。PAF-AH活性部分をセントリップ30で濃縮し、精製PAF-AHとした。

10

【0130】

(活性の測定)

上記合成した化合物番号1~13、15~17、20及び25について、PAF-AH活性を測定した。

以下の溶液、

緩衝液：150mM NaCl、10mM EDTAを含む50mM HEPES緩衝液 (pH7.4)；及び、

基質溶液：4mMの基質、90mM NaCl、6mM EDTA、及び40%エタノールを含む30mM HEPES緩衝液 (pH7.4)を調製した。

20

【0131】

上記方法で得られたPAF-AH精製品10 μ lと緩衝液900 μ lとを混合し、37℃の恒温槽に5分放置した後、基質溶液を100 μ l添加して、反応を開始した。基質溶液添加後、2分目から5分目にかけての単位時間 (1分間) 当たりの吸光度の変化量 (ΔE_s) とパラニトロフェノールの分子吸光係数 $\epsilon = 12000$ (ただし、化合物番号13、15及び16の化合物においては分子吸光係数 $\epsilon = 18000$ を使用) とからPAF-AH活性値 (nmol/min/試料1ml) を上記の式により、算出した。その結果を表1に示す。式中、 ΔE_B は試料の代わりに精製水を加えて測定した値である。

【0132】

【表1】

30

基質 (化合物番号)	活性値	
1	8 3	
2	9 8	
3	1 3 3	
4	1 1 1	10
5	5 5	
6	4 8	
7	6 2	
8	4 5 7	
9	1 2 3	
10	5 0	
11	3 7	20
12	1 7	
13	6 2	
15	6 7	
16	7 8	
17	4 4	
20	2 6 5	
25	7 7	30

【0133】

この結果から、化合物番号8の1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルサクシニル)-sn-グリセロールホスホコリン(一般式(I)のA=2)が最も基質特異性が高いことがわかった。これは、一般的に使用される化合物番号4の1-ミリストイル-2-(4-ニトロフェニルグルタリル)-sn-グリセロールホスホコリン(一般式(I)のA=3)よりも、4倍以上も基質特異性が高いことを示している。

【0134】

一般式(I)のA=4~7の化合物(化合物番号9~12)もPAF-AH活性が検出されたが、Aが小さいほど活性は高い傾向にある。また、一般式(I)のアシル基(R₁)の炭素数が8~18(化合物番号1~5、及び25)の場合も活性が検出された。また、R₁がアルキル基、アルケニル基(化合物番号6及び7)の場合も活性が検出された。R₁は、あまり活性には大きな影響を与えないようであった。更に、ハロゲン置換ニトロフェニル化合物を遊離する基質(基質番号13、15及び16)も、有用であることが示さ

れた。

【0135】

以下、特異性が高い基質（化合物番号8：1-ミリストイル-2-（4-ニトロフェニルサクシニル）-sn-グリセロホスホコリン、以下、本発明の基質という）を用いた実施例を示す。

【0136】

（実施例3：PAF-AH活性の測定；阻害剤の効果）

以下の阻害剤溶液と基質溶液とをそれぞれ、調製した。

阻害剤溶液：表2に記載の阻害剤を、150mM NaClを含む50mM HEPES緩衝液（pH7.4）に、表2に記載の濃度で溶解した。

基質溶液：4mMの本発明の基質、40%エタノール及び90mM NaClを含む30mM HEPES緩衝液（pH7.4）。

【0137】

ヒトプール血清又はPAF-AH精製品10 μ lと阻害剤溶液900 μ lとを混合し、37℃の恒温槽に5分放置した後、基質溶液100 μ lを添加して、反応を開始した。基質溶液添加後、2分目から5分目にかけての単位時間（1分間）当たりの吸光度の変化量（ ΔE ）とパラニトロフェノールの分子吸光係数 $\epsilon = 12000$ とからPAF-AH活性値（nmol/min/試料1ml）を算出した。その結果を表2に示す。

【0138】

【表2】

	ヒトプール血清		PAF-AH精製品	
	活性値	相対活性	活性値	相対活性
なし	389	100	256	100
ラウリル硫酸ナトリウム (1mM)	267	69	208	81
デカンスルホン酸 (2.5mM)	289	74	244	95
Triton X-100 (0.05%)	342	88	247	96
Tween-20 (0.05%)	294	76	239	93
CHAPS (5mM)	347	89	264	103
コール酸ナトリウム (5mM)	347	89	250	98
ラウリル硫酸ナトリウム (1mM)				
+Triton X-100 (0.05%)	225	58	200	78
ラウリル硫酸ナトリウム (1mM)				
+CHAPS (5mM)	269	69	247	96

【0139】

各種阻害剤存在下において、ヒトプール血清とPAF-AH精製品とでは、その阻害の程度に大きな差異が観察された。すなわち、PAF-AH精製品が、ほぼ、90%以上の活性

を保持している（阻害剤による活性の低下が小さい）のに対し、ヒトプール血清には90%以上の活性が保持されているものがない。これは、P A F - A H精製品が精製された結果、非特異的加水分解反応を生じる物質の含有量が少ないため、阻害剤により相対活性が低下しにくいと考えられるのに対して、ヒトプール血清には非特異的加水分解反応を生じる物質が多く含まれており、阻害剤によってこの非特異的加水分解活性が抑制された結果、相対活性が低下したことを示唆する。

【0140】

（実施例4：P A F - A H活性の測定：従来法との相関）

以下の試薬を準備した。

試薬1(A)：150mM N a C lを含む50mM H E P E S緩衝液(pH7.4)

10

試薬2(A)：基質溶液；1.6mMの本発明の基質、16%エタノール及び150mM N a C lを含む50mM H E P E S緩衝液(pH7.4)；

試薬1(B)：阻害剤溶液；150mM N a C l、10mM EDTA、1mM ラウリル硫酸ナトリウム、5mM C H A P Sを含む50mM H E P E S緩衝液(pH7.4)；及び

試薬2(B)：阻害剤を含む基質溶液；150mM N a C l、10mM EDTA、1mM ラウリル硫酸ナトリウム、5mM C H A P S、16%エタノール及び1.6mMの本発明の基質を含む50mM H E P E S緩衝液(pH7.4)。

血清試料：5種類の試料S1、S2、S3、S4およびS5。

【0141】

P A F - A H活性の測定には、H-7170型自動分析装置（日立製作所）を使用した。

20

測定時のパラメーターは、以下の通りである。

【0142】

【表3】

入力項目	入力
RATE-A	25-34 POINT
S VOLUME	5 μ l
R1 VOLUME	240 μ l
R2 VOLUME	80 μ l
Wavelength	505-405 nm
K-FACTOR	5417

30

【0143】

上記パラメーターに従って、血清試料5 μ lと試薬1(A)（緩衝液）又は1(B)（阻害剤溶液）240 μ lとを分注して混合し、一定の恒温時間（37℃、5分間）の後、試薬2(A)（基質溶液）又は試薬2(B)（阻害剤を含む基質溶液）80 μ lを添加、混合して、反応を開始した。このときの吸光度変化（タイムコース）を図1ならびに図2に示す。試料と試薬1(A)又は1(B)の混合液に本発明の基質を含む溶液を添加すると、P A F - A Hと本発明の基質との反応によって本発明の基質から生成する4-ニトロフェノールに由来する吸光度の上昇が確認された。

40

【0144】

図1及び図2の比較から明らかなように、阻害剤が存在しない場合（図1）より、阻害剤が存在する場合（図2）の方が吸光度の上昇が抑制されている。このことも、阻害剤により基質の非特異的加水分解が抑制されることを示唆している。

【0145】

P A F - A H活性は、基質（試薬2(A)又は試薬2(B)）の添加後2分目から5分目にかけての単位時間（1分間）当たりの吸光度の変化量（ ΔE ）とパラニトロフェノールの分子

50

吸光係数 $\varepsilon = 12000$ を用いて計算し、各血清試料の PAF-AH 活性値を算出した。

【0146】

他方で、従来法である、放射性標識した PAF を基質に用いてヒト血清 PAF-AH 活性を測定し、本発明の方法の有用性を確認した。

【0147】

1-0-オクタデシル [オクタデシル-9, 10^{-3} H(N)] 2-0-アセチル-sn-グリセロホスホコリン (NEN社, NET-1009) 5 pmole (18.5kBq)、1-0-オクタデシル-2-0-アセチル-sn-グリセロホスホコリン (BACHEM FEINCHEMIKALIEN AG社, 0-1355) 34 pmole、及びヒト血清適量 (50-100倍希釈、6.5-37.5 μ l、各サンプル3濃度段階) を 100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.4)、5mM EDTA に懸濁し、全量を 0.1ml にして 37°C で 10 分間インキュベートした。反応終了後、Bligh & Dyer 法により脂質を抽出した。即ち、クロロホルム 0.125ml とメタノール 0.25ml を加えて 2 分間振とうし、次に、クロロホルム 0.125ml を加えて 30 秒間振とうし、最後に、水を 0.1ml 加えて 30 秒間振とうする。その後、遠心分離 (400g、3 分間) し、下層 (有機層) 0.04ml を TLC (Merck, 5554-1M) にスポットし、展開溶媒 (クロロホルム : メタノール : 水 = 65 : 35 : 6) で展開した。放射能は、フジフィルム社製バイオイメージングアナライザー MacBAS5000 を用いて測定した。酵素活性は試料であるヒト血清の用量 (μ l) と反応時間 (10 分) とで測定された放射能により換算される生成リゾPAF 量 (nmol) を用いて、単位時間、単位液量当りに生成するリゾPAF のモル数を求め、nmol/min/ml で表した。

10

【0148】

本発明の基質を用いた測定の結果 (Y) と放射性標識 PAF を用いた測定結果 (X) との相関を、阻害剤なしの場合を図 3 に、阻害剤ありの場合を図 4 にそれぞれ示した。阻害剤なしの場合 (図 3) の回帰直線は、 $Y = 206X + 307$ 、相関係数は、 $R = 0.970$ であった。阻害剤ありの場合 (図 4) の回帰直線は、 $Y = 179X + 93.6$ 、相関係数は、 $R = 0.997$ であった。このように、いずれの場合においても、強い相関関係がみられ、かつ、阻害剤がある場合は、極めて強い相関関係が見られ、本発明の基質及び本発明の測定方法の有用性が確認された。

20

【0149】

(実施例 5 : PAF-AH の測定)

実施例 4 と同様、本発明の基質を用い、正常域プール血清 (商品名 : ネスコール-X 製造元 財団法人 化学及血清療法研究所、発売元株式会社アズウェル) 中の PAF-AH 活性を測定した。それらの各試験を 10 回繰り返し行った測定結果を表 4 に示す。

30

【0150】

【表 4】

(nmol/min/試料1ml)			
	阻害剤なし	阻害剤あり (本発明方法)	
1	640	348	10
2	671	329	
3	598	348	
4	603	346	
5	656	344	
6	603	336	
7	593	336	
8	585	332	
9	613	344	
10	681	329	20
平均	624	339	
標準偏差	34.8	7.7	
C. V. (%)	5.6	2.3	

【0151】

表4に示すように、本発明の方法は、精度良く血清中のPAF-AH活性を測定する方法であることが確認された。 30

【0152】

【発明の効果】

本発明のPAF-AH活性測定法によれば、放射性標識基質を用いることなく、試料中のPAF-AH活性を直接測定することが可能となるので、日常の検査に安全、迅速、簡単な測定方法として充分利用できる。

また、本発明のPAF-AH活性測定法は、従来の方法より測定時間が短縮されること、種々エステラーゼやエステラーゼ様物質の影響を受けないこと、発色性化合物をモニターすることにより直接的にPAF-AH活性を測定することができる等の利点を有するため、従来の、発色系へ誘導する酵素や試薬を使用する方法に比べて、より正確、かつ迅速な測定が可能であることから、疾患の検定、予後の経過を短時間で診断できるようになる。従って、本発明は、極めて有用性が高い、PAF-AH活性測定法を提供する。 40

【図面の簡単な説明】

【図1】阻害剤がない場合の試料中のPAF-AH活性を測定した時のタイムコースを示した図である。

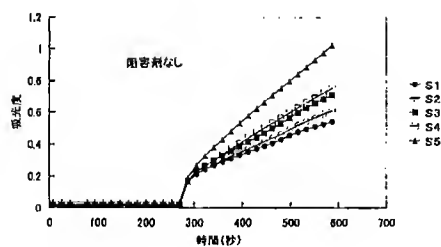
【図2】阻害剤がある場合の試料中のPAF-AH活性を測定した時の吸光度の変化を示した図である。

【図3】阻害剤を用いない測定方法と放射性標識基質を用いる測定方法との相関を示した図である。

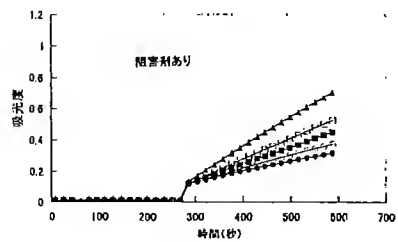
【図4】阻害剤を用いる場合の測定方法（本発明の測定方法）と放射性標識基質を用いる 50

測定方法との相関を示した図である。

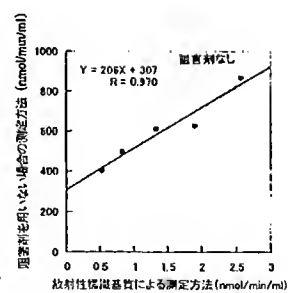
【図1】



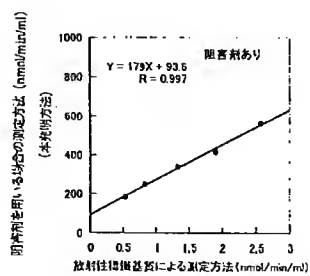
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 岩倉 文月
大阪府大阪市東淀川区豊里2丁目13-7-406

(72)発明者 宗田 靖二
兵庫県神戸市東灘区本山北町4丁目5番11号

審査官 三原 健治

(56)参考文献 特開平04-346797 (JP, A)
特開平02-003662 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00-1/70
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/Caplus/EMBASE(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)